

Université de Sherbrooke

**Récepteurs de l'endothéline-1 dans le noyau des cellules endothéliales
endocardiques humaines : implication dans la régulation du calcium nucléaire et
le trafic transcellulaire**

Par

FARAH JULES

Département d'Anatomie et de Biologie Cellulaire

Évaluateurs :

Dr. Danielle Jacques
Département d'Anatomie et de Biologie Cellulaire
Dr. Pierre-H. Vachon
Département d'Anatomie et de Biologie Cellulaire
Dr. Pierre Sirois
Département de Pharmacologie

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès Science (M.Sc.) en Biologie Cellulaire

Mai 2007



Library and
Archives Canada

Published Heritage
Branch

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Direction du
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence
ISBN: 978-0-494-42967-9
Our file Notre référence
ISBN: 978-0-494-42967-9

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

*À mes parents,
Michelle et Jean-Gaston
Pour leur dévotion absolue
Pour m'avoir montrée persévérance, ténacité et courage
Pour avoir fait de moi ce que je suis*

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	VII
TABLEAU.....	IX
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	X
RÉSUMÉ.....	XV
I- INTRODUCTION	1
1.1 LE CŒUR	2
1.2 L'ENDOTHÉLIUM ENDOCARDIQUE	5
1.2.1 Structure	6
1.2.2 Rôle.....	13
1.2.3 Interaction entre l'endothélium endocardique et le myocarde	16
1.2.4 L'endothélium endocardique est une barrière physico-chimique	18
1.2.5 Facteurs relâchés par l'endothélium endocardique	19
1.3 L'ENDOTHÉLINE	20
1.3.1 Découverte et structure de l'endothéline.....	20
1.3.2 La biosynthèse de l'ET-1.....	24
1.4 LES RÉCEPTEURS DE L'ENDOTHÉLINE	27
1.4.1 ET-1 et voies de signalisation.....	31
1.4.2 Le récepteur ET _A	33
1.4.3 Le récepteur ET _B	35
1.4.4 Présence de récepteurs couplés aux protéines G dans le noyau	37
1.5 LE NOYAU	41
1.6 LE CALCIUM	42
1.6.1 Les canaux calciques dans les cellules endothéliales endocardiques.....	44
1.7 L'ET-1 PEUT INDUIRE L'INTERNALISATION DE SES RÉCEPTEURS.....	45
1.8 L'ET-1 ET L'ENDOTHÉLIUM ENDOCARDIQUE.....	54
1.9 HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS DE TRAVAIL.....	59
II-MATÉRIEL ET MÉTHODES	62
2.1 ISOLATION ET CULTURE DES CELLULES ENDOTHÉLIALES ENDOCARDIQUES DU CŒUR FŒTAL HUMAIN ÂGÉ DE 20 SEMAINES	63

2.2	MICROSCOPIE CONFOCALE	65
2.2.1	Principe de base	65
2.2.2	Balayage des cellules.....	68
2.3	ÉTUDE DU NOYAU	71
2.3.1	Chargement des cellules avec la sonde calcique Fluo-3/AM.....	71
2.3.2	Études de la fluorescence calcique du noyau	72
2.3.3	Marquage du noyau	74
2.3.4	Mesure du calcium nucléaire.....	74
2.4	ÉTUDE DE LA MOBILISATION DES RÉCEPTEURS À L'ET-1	75
2.4.1	Marquage des récepteurs ET _A et ET _B	75
2.4.2	Traitement avec l'ET-1.....	76
2.4.3	Traitement avec l'ET-1 en présence de cycloheximide	77
2.4.4	Technique de l'immunofluorescence indirecte	77
2.4.5	Visualisation et quantification du marquage par microscopie confocale	78
2.5	STATISTIQUES	79
III	RÉSULTATS	80
3.1	EFFET DE L'ET-1 CYTOSOLIQUE SUR LE [Ca²⁺]_N BASAL DES CEEGs ET CEEDs À MEMBRANE PLASMIQUE PERFORÉE	81
3.2	EFFET DE L'ADMINISTRATION CYTOSOLIQUE DES ANTAGONISTES DES RÉCEPTEURS ET_A ET ET_B SUR L'AUGMENTATION DU [Ca²⁺]_N INDUITE PAR L'ET-1 CYTOSOLIQUE DANS LES CEEGs ET CEEDs.....	88
3.2.1	Effet préventif de l'antagoniste du récepteur ET _A , le ABT-627, sur l'augmentation du [Ca ²⁺] _n induite par l'ET-1 cytosolique dans les CEEs à membrane plasmique perforée	89
3.2.2	Effet préventif de l'antagoniste du récepteur ET _B , le A-192621, sur l'augmentation du [Ca ²⁺] _n induite par l'ET-1 cytosolique dans les CEEs à membrane plasmique perforée	92
3.3	L'ET-1 INDUIT LA MOBILISATION DE SES RÉCEPTEURS DANS LES CEEGs ET LES CEEDs	100
3.3.1	Effet de l'ET-1 extracellulaire sur la mobilisation du récepteur ET _A dans les CEEGs et les CEEDs	101
3.3.2	Effet de la cycloheximide sur la densité des récepteurs ET _A dans les CEEGs et CEEDs prétraitées à l'ET-1	105
3.3.3	Effet de l'ET-1 extracellulaire sur la mobilisation du récepteur ET _B dans les CEEGs et les CEEDs	109
3.3.4	Effet de la cycloheximide sur la densité des récepteurs ET _B dans les CEEGs et CEEDs traitées à l'ET-1	114

IV-DISCUSSION ET CONCLUSIONS	119
V-REMERCIEMENTS.....	127
VI-RÉFÉRENCES	130

LISTE DES FIGURES

Figure 1	Le péricarde et la paroi du cœur	3
Figure 2	Endothélium endocardique et matrice extracellulaire	7
Figure 3	Marquage fluorescent du réticulum endoplasmique, des mitochondries et du noyau dans les cellules isolées de l'endothélium endocardique.....	10
Figure 4	Effet de l'endothélium endocardique sur la contraction isométrique du muscle cardiaque	14
Figure 5	Interactions entre les cellules endothéliales endocardiques et les cardiomyocytes.....	17
Figure 6	Structure des endothéline-1, -2 et -3 humaines	22
Figure 7	Biosynthèse de l'ET-1	25
Figure 8	Représentation schématique de l'internalisation des récepteurs ET _A et ET _B dans les CMLVs humaines	52
Figure 9	Marquage de l'ET-1 et de ses récepteurs ET _A et ET _B dans les CEEGs et CEEDs isolées du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines	55
Figure 10	Effet de différentes concentrations d'ET-1 extracellulaire sur les niveaux soutenus du [Ca ²⁺] _c et du [Ca ²⁺] _n des CEEGs et des CEEDs isolées du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines.....	57
Figure 11	Le point focal et le point confocal dans le système de la microscopie confocale.....	66
Figure 12	Les compartiments optiques du système de la microscopie confocale ...	69
Figure 13	Expérience représentative de l'effet de concentrations croissantes d'ET-1 cytosolique sur le niveau basal de calcium nucléaire ([Ca ²⁺] _n) dans les CEEGs et CEEDs à membrane plasmique perforée.....	83
Figure 14	Effet de concentrations croissantes d'ET-1 cytosolique sur le niveau basal de [Ca ²⁺] _n des CEEGs et des CEEDs à membrane plasmique perforée..	86
Figure 15	Expérience représentative de l'effet préventif de l'antagoniste du récepteur ET _A , le ABT-627, sur l'augmentation du [Ca ²⁺] _n induite par l'ET-1 cytosolique dans les CEEs à membrane plasmique perforée.....	90

Figure 16	Effet préventif de l'antagoniste du récepteur ET _A , le ABT-627, sur l'augmentation du [Ca ²⁺] _n induite par l'ET-1 cytosolique dans les CEEs à membrane plasmique perforée	93
Figure 17	Expérience représentative de l'effet préventif de l'antagoniste du récepteur ET _B , le A-192621, sur l'augmentation du [Ca ²⁺] _n induite par l'ET-1 cytosolique dans les CEEs à membrane plasmique perforée.....	96
Figure 18	Effet préventif de l'antagoniste du récepteur ET _B , le A-192621 sur l'augmentation du [Ca ²⁺] _n induite par l'ET-1 cytosolique dans les CEEs à membrane plasmique perforée	98
Figure 19	Effet de l'ET-1 extracellulaire sur la mobilisation du récepteur ET _A dans les CEEGs et les CEEDs	102
Figure 20	Effet de la cycloheximide sur la densité relative du récepteur ET _A dans les CEEGs et CEEDs traitées à l'ET-1	107
Figure 21	Effet de l'ET-1 extracellulaire sur la mobilisation du récepteur ET _B dans les CEEGs et les CEEDs	111
Figure 22	Effet de la cycloheximide sur la densité relative du récepteur ET _B dans les CEEGs et CEEDs prétraitées à l'ET-1.....	115

TABLEAU

Tableau I Caractéristiques biochimiques et pharmacologiques des récepteurs ET _A et ET _B	29
--	----

LISTE DES ABRÉVIATIONS

$[Ca^{2+}]_c$	Concentration du calcium libre cytosolique
$[Ca^{2+}]_i$	Concentration du calcium libre intracellulaire
$[Ca^{2+}]_n$	Concentration du calcium libre nucléaire
°C	Degré Celsius
µg	Microgramme
µl	Microlitre
µM	Micromolaire
2D	Bidimensionnel
3D	Tridimensionnel
ACE	Enzyme de conversion de l'Angiotensine
Ach	Acétylcholine
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
Ang I	Angiotensine I
Ang II	Angiotensine II
ANP	Peptide natriurétique auriculaire
Arg	Arginine
ARNm	Acide ribonucléique messenger
AT ₁	Récepteur à l'angiotensine II de type 1
AT ₂	Récepteur à l'angiotensine II de type 2
ATP	Adénosine 5'-triphosphate
B ₂	Récepteur à la bradykinine de type 2
bFGF	Facteur de croissance fibroblastique basique

BK	Bradykinine
BSA	Albumine de sérum bovin
Ca ²⁺	Calcium
CaM	Calmoduline
CAV-1	Cavéoline-1
CAV-3	Cavéoline-3
CE	Cellule endothéliale
CEE	Cellule endothéliale endocardique
CEED	Cellule endothéliale endocardique isolée du ventricule droit
CEEG	Cellule endothéliale endocardique isolée du ventricule gauche
CEV	Cellule endothéliale vasculaire
CMLV	Cellule du muscle lisse vasculaire
CO ₂	Dioxyde de carbone
COX-2	Cyclooxygénase de type 2
CTX	Toxine du choléra
Cx37	Connexine de type 37
Cx40	Connexine de type 40
Cx43	Connexine de type 43
Cys	Cystéine
DAG	Diacylglycérol
DiOC ₆	3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide
DMSO	Diméthyl sulfoxyde
EC ₅₀	Concentration produisant 50% de la réponse maximale

ECE	Enzyme de conversion de l'endothéline
EE	Endothélium endocardique
EGTA	Acide éthylène glycol-bis(β -aminoéthyl éther) N, N, N', N'- tétraacétique
EP ₃	Récepteur à la prostaglandine E ₂ de type 3
ERK	Kinases régulées par signaux extracellulaires
E.S.M.	Erreur standard de la moyenne
ET-1	Endothéline-1
ET-2	Endothéline-2
ET-3	Endothéline-3
ET _A	Récepteur de l'endothéline de type A
ET _B	Récepteur de l'endothéline de type B
ET _C	Récepteur de l'endothéline de type C
FBS	Sérum de bovin fœtal
FITC	Fluorescéine Isothiocyanate
Flk-1	Kinase de foie foetal de type 1
HEPES	Acide (N-[2-hydroxyéthyl] piperazine-N'-[2-éthanesulfonique])
GFP	Protéine fluorescente verte
GMPc	Guanosine monophosphate cyclique
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphate
kDa	Kilodalton
LAMP-1	Protéine membranaire associée aux lysosomes de type 1
LAMP-2	Protéine membranaire associée aux lysosomes de type 2

Lys	Lysine
MAPK	Protéine kinase activée par les mitogènes
mg	Miligramme
min	Minute
ml	Millilitre
mM	Millimolaire
mOsm	Milliosmole
n	Nombre de cellules
N	Nombre d'expériences
NaBH ₄	Sodium borohydrure
NFDM	Lait non gras en poudre
NFκB	Facteur nucléaire kappa B
NGS	Sérum normal de chèvre
nM	Nanomolaire
NO	Monoxyde d'azote
NOS	NO synthase
NPY	Neuropeptide Y
O ₂	Oxygène
p	probabilité
PAF	Facteur activateur des plaquettes
PAL-E	Pathologische Anatomie Leiden-endothelium
PBS	Tampon phosphate salin
PG	Prostaglandine

PGE ₂	Prostaglandine E ₂
PGI ₂	Prostacycline
PKC	Protéine kinase C
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
PMT	Multiplicateur de photon
PTX	Toxine pertussique
RCPG	Récepteur couplé aux protéines G
RE	Réticulum endoplasmique
rpm	Révolution par minute
SLN	Séquence de localisation nucléaire
Tie-2	Kinase de la tunique interne des cellules endothéliales
TGF-β	Facteur de croissance transformant β1
TNF-α	Facteur de nécrose tumorale de type α
Trp	Tryptophane
VEGF	Facteur de croissance des cellules endothéliales vasculaires
Val	Valine
vWF	Facteur de Von Willebrand
VOCC	Canaux calciques voltage dépendants
Y ₁	Récepteur au neuropeptide Y de type 1
Y ₂	Récepteur au neuropeptide Y de type 2

**Récepteurs de l'endothéline-1 dans le noyau des cellules endothéliales
endocardiques humaines : implication dans la régulation du calcium nucléaire et
le trafic transcellulaire**

Par

Farah Jules

Département d'Anatomie et de Biologie Cellulaire
Université de Sherbrooke
Mémoire présenté à la Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès science (M.Sc.) en Biologie Cellulaire

Mai 2007

RÉSUMÉ

L'ET-1, un peptide de 21 acides aminés, est un des plus puissants vasoconstricteurs isolés à date. Il est présent dans plusieurs tissus et est responsable de nombreuses actions biologiques. Chez l'humain, ces effets sont relayés par deux récepteurs couplés aux protéines G : ET_A et ET_B. Précédemment, notre groupe a démontré que ces récepteurs sont présents au niveau de la membrane plasmique, du cytosol et du noyau incluant les membranes de l'enveloppe nucléaire des cellules endothéliales endocardiques isolées des ventricules gauche (CEEGs) et droit (CEEDs) du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines. De plus, notre groupe a montré que suite à l'activation des récepteurs à l'ET-1 situés au niveau de la membrane plasmique, l'ET-1 augmente le niveau de Ca²⁺ intracellulaire libre des CEEs; les CEEGs étant plus sensibles à l'ET-1 que les CEEDs. Basé sur ces résultats, nous allons tester l'hypothèse que les récepteurs de l'ET-1, et en particulier le récepteur ET_B, présents au niveau des membranes de l'enveloppe nucléaire des CEEs augmentent le Ca²⁺ nucléoplasmique et que la sensibilité de ces récepteurs nucléaires est différente de celle connue pour les récepteurs à l'ET-1 de la membrane plasmique. De plus, il est possible que l'activation des récepteurs ET_A et/ou ET_B de la membrane de surface induit leur internalisation, translocation ainsi que leur synthèse *de novo*. Nous proposons aussi que ces phénomènes peuvent être différents dans les CEEGs et les CEEDs. Dans la première partie de ce mémoire, nous avons étudié l'effet de concentrations croissantes d'ET-1 cytosolique sur le niveau de calcium nucléoplasmique des CEEGs et des CEEDs. Au niveau des noyaux des CEEDs, nous avons observé que la valeur de EC₅₀ obtenue est plus élevée (1000 fois) que celle des

noyaux des CEEGs suggérant que les récepteurs à l'ET-1 présents au niveau des membranes de l'enveloppe nucléaire sont plus sensibles à l'ET-1 au niveau des CEEGs par rapport aux CEEDs. Nos résultats montrent également que les récepteurs à l'ET-1 des membranes de l'enveloppe nucléaire des CEEDs et des CEEGs sont plus sensibles à l'ET-1 que ces mêmes récepteurs présents au niveau de la membrane plasmique et ce de 1000 fois pour les CEEGs et de 10 fois pour les CEEDs. De plus, nos résultats montrent qu'au niveau des CEEDs et des CEEGs, l'ET-1 cytosolique induit une augmentation du $[Ca^{2+}]_n$ qui est relayée par le récepteur ET_B . Dans la deuxième partie de ce mémoire, nous avons démontré que le traitement des cellules avec l'ET-1 à différents temps pouvait induire la mobilisation des récepteurs ET_A et ET_B . Nous avons observé une similarité dans le profil de mobilisation des récepteurs ET_A et ET_B au niveau des CEEDs suggérant que la cinétique de l'internalisation, de la dégradation et de la synthèse *de novo* peut être la même indépendamment du type de récepteur activé. De plus, nos résultats montrent que la cinétique et le décours de la mobilisation des récepteurs ET_A et ET_B est différent dans les CEEGs par rapport aux CEEDs suggérant qu'il est important de considérer l'origine anatomique des CEEs. Nos résultats montrent également que la plupart des augmentations dans les niveaux du récepteur ET_A et ET_B au niveau des CEEs sont dues à des synthèses *de novo* sensibles à la cycloheximide.

Mots-clés : Endothéline-1, Récepteurs ET_A et ET_B , Cellules endothéliales endocardiques, Noyau, Calcium, Mobilisation des récepteurs

I- INTRODUCTION

1.1 Le cœur

Le cœur est un muscle puissant qui agit comme une pompe dont le rôle est d'approvisionner les organes du corps en sang enrichi d'O₂ pour permettre leur fonctionnement. Ce muscle infatigable peut accomplir une telle tâche par un battement moyen de 60 à 90 fois par minute et par la propulsion de 5 à 6 litres de sang par minute dans le système circulatoire.

Du point de vue anatomique, le cœur possède 4 cavités :

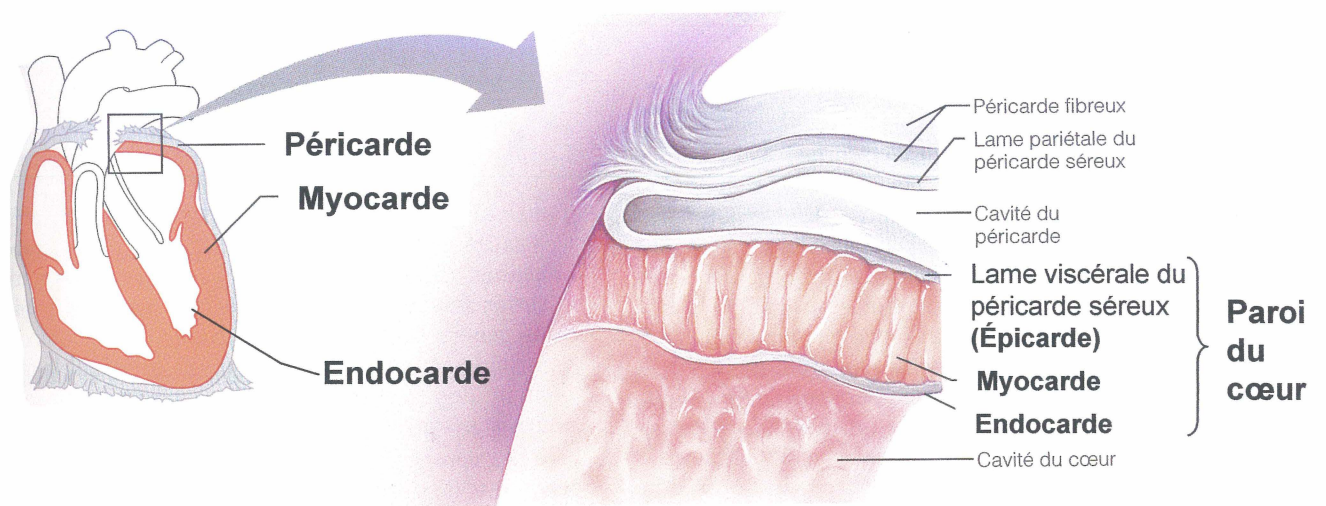
- Deux oreillettes au niveau supérieur; l'oreillette droite reçoit le sang impur, riche en CO₂ et pauvre en O₂, via les veines tandis que l'oreillette gauche reçoit le sang oxygéné des poumons pour l'acheminer au ventricule gauche.
- Deux ventricules au niveau inférieur; le ventricule droit reçoit le sang de l'oreillette droite et l'envoie aux poumons tandis que le ventricule gauche propulse le sang oxygéné afin d'approvisionner les autres régions du corps.

Le cœur est enveloppé dans un sac à double paroi, nommé péricarde, qui le maintient dans le centre de la cage thoracique. La paroi cardiaque est composée de trois tuniques vascularisées (Figure 1) (voir revue GAVAGHAN, 1998):

Figure 1 Le péricarde et la paroi du cœur

Le péricarde est la membrane qui entoure et protège le cœur. Il est constitué de 3 feuillets; fibreux, séreux pariétal et séreux viscéral (aussi appelé épicarde). L'épicarde est la couche la plus externe de la paroi et adhère fermement à la surface du cœur. Le myocarde est la couche musculaire médiane formée de cardiomyocytes contractiles. L'endocarde constitue la couche la plus interne du cœur et est formé d'une monocouche de cellules endothéliales en contact direct avec le sang circulant.

Modifiée de MARIEB et LACHAÎNE (2005, p. 697)



- 1- **Épicarde:** aussi appelée lame viscérale du péricarde séreux, il s'agit de la couche la plus externe de la paroi qui adhère fermement à la surface du cœur et qui le protège;
- 2- **Myocarde:** la couche intermédiaire de la paroi constituant l'essentiel de la masse du cœur. Elle est composée de cardiomyocytes qui ont la propriété de se contracter;
- 3- **Endocarde:** la couche la plus interne de la paroi, elle est en contact avec le sang. Il s'agit d'un endothélium formé d'une monocouche de cellules endothéliales qui est en continuité avec l'endothélium des gros vaisseaux.

Les cardiomyocytes constituent la majorité du tissu cardiaque représentant environ 75 % du volume total de ce dernier. Cependant, de la totalité des cellules cardiaques, les cardiomyocytes comptent pour moins de 40%; la majorité des cellules étant des fibroblastes, des cellules sanguines, des cellules endothéliales, des macrophages et des cellules du muscle lisse vasculaire (revue par BRUTSAERT, 2003).

1.2 L'endothélium endocardique

L'endothélium a longtemps été considéré comme une simple barrière séparant le sang des tissus qu'il tapisse. Un rôle très important fut attribué à l'endothélium vasculaire pour son implication dans la régulation du tonus vasculaire (VANE, 1968; FURCHGOTT et ZAWADZKI, 1980; revue par BRUTSAERT, 2003). Ces travaux ont élevé l'endothélium au rang de structure fonctionnelle essentielle au système cardiovasculaire. En effet, l'endothélium contribue à l'homéostasie cardiovasculaire non seulement en régularisant la perméabilité vasculaire mais également en ajustant la

dimension des vaisseaux sanguins en réponse aux demandes hormonales et hémodynamiques et en maintenant la fluidité sanguine (revue par BRUTSAERT, 2003).

Pour faire suite à ces travaux, le groupe de Brutsaert en 1986 a présenté des études démontrant l'importance de l'endothélium endocardique (EE) dans le maintien et la régulation de la fonction cardiaque. Ces études ont marqué le début de plusieurs travaux dont l'intérêt portait sur une meilleure compréhension de l'implication de cette structure au niveau de la fonction du cœur.

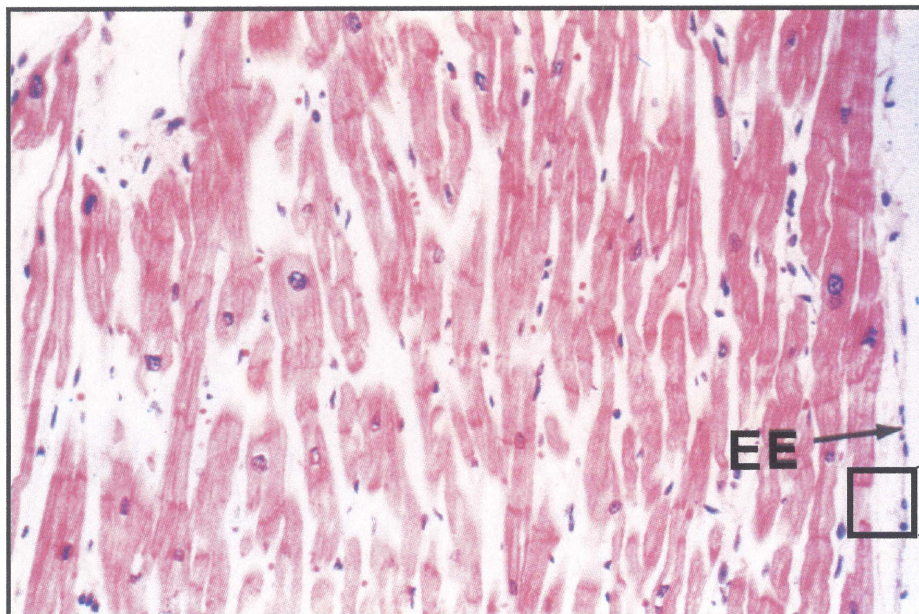
1.2.1 Structure

L'endothélium endocardique (EE) est une monocouche de cellules polygonales de 0.5 μm d'épaisseur qui tapisse les cavités du cœur y compris les trabécules et les muscles papillaires localisés à sa surface luminale (Figure 2) (revues par BRUTSAERT *et al.*, 1996 et RHODIN JOHANNES, 1974). Ce réseau de trabécules, en plus de la présence de nombreuses microvillosités, augmentent d'un facteur de 100 la surface de contact entre l'EE et le sang circulant suggérant ainsi un rôle important de senseur à ces cellules. Ce rôle est effectivement appuyé par la présence de nombreux récepteurs pour divers peptides et hormones circulant dans le sang comme l'endothéline-1, les minéralocorticoïdes et le peptide natriurétique auriculaire (ANP) (revue par BRUTSAERT *et al.*, 1996).

Figure 2 Endothélium endocardique et matrice extracellulaire

L'endothélium endocardique (EE) est la couche la plus interne du cœur et est constitué d'une monocouche de cellules endothéliales. Une matrice extracellulaire sépare les CEEs des cardiomyocytes sous-jacents (couleur rose) et est constituée d'une lame basale, d'une lame réticulée contenant des fibres de collagène, ainsi que d'une couche fibroblastique contenant des fibroblastes, des vaisseaux sanguins et un plexus nerveux.

Modifiée de RHODIN JOHANNES, 1974



EE

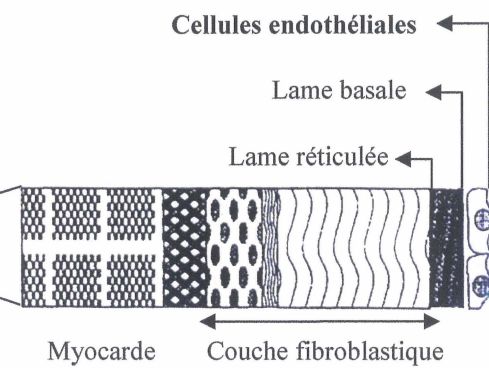
Cellules endothéliales

Lame basale

Lame réticulée

Myocarde

Couche fibroblastique



L'espace sous-endothélial, ou matrice extracellulaire, séparant les cellules endothéliales endocardiques (CEEs) des cardiomyocytes, consiste en une lame basale et une lame réticulée comportant des fibres de collagène fusionnant avec des fibres de la couche fibroélastique. Cette matrice extracellulaire, comprend aussi un plexus nerveux, des fibroblastes et des vaisseaux sanguins (revue par BRUTSAERT *et al.*, 1996). Le plexus nerveux est composé de nerfs et fibres sympathiques capables de relâcher plusieurs peptides dont le NPY qui est un des plus abondants (MARRON *et al.*, 1994; JACQUES *et al.*, 2003b).

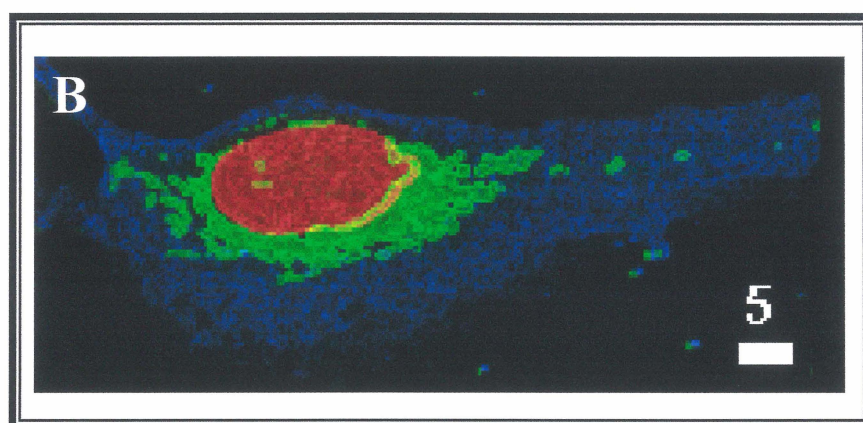
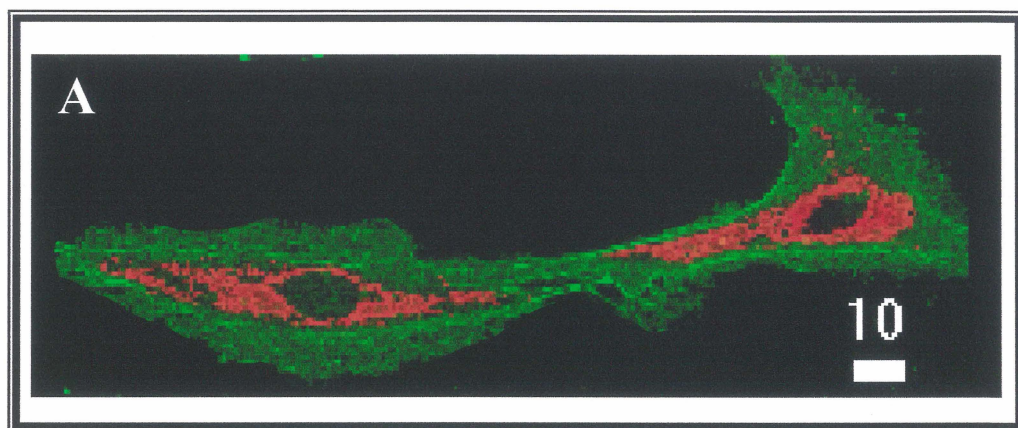
Les CEEs sont plus larges que la plupart des cellules endothéliales présentes dans les autres régions du système circulatoire. Elles possèdent un appareil de Golgi et un réticulum endoplasmique bien développés en plus d'un grand nombre de mitochondries entourant un large noyau (Figure 3) suggérant que ces cellules sont métaboliquement très actives (BRUTSAERT *et al.*, 1996; JACQUES *et al.*, 2003b). La présence de corps de Weibel-Palade a également été démontrée dans ces cellules (ANDRIES et BRUTSAERT, 1990; LOWENSTEIN *et al.*, 2005). Ces structures contiennent le facteur de Von Willebrand (vWF) qui joue un rôle important dans la coagulation sanguine, l'adhérence des plaquettes à la matrice extracellulaire ainsi que dans l'agrégation des plaquettes (SPORN *et al.*, 1989).

L'EE constitue un revêtement parfaitement lisse qui diminue la friction du sang contre les parois cardiaques (MARIEB et LACHAÎNE, 2005). Cependant, cette structure est continuellement soumise à des stress physico-mécaniques dus aux

Figure 3 Marquage fluorescent du réticulum endoplasmique, des mitochondries et du noyau dans les cellules isolées de l'endothélium endocardique

(A) Marquage du réticulum endoplasmique avec la sonde fluorescente, le DiOC₆ (couleur orange). Les CEEs possèdent un réseau bien développé de réticulum endoplasmique. (B) Marquage des mitochondries avec la sonde fluorescente, le MitoFluor (couleur verte) et du noyau avec le Syto-11 (couleur rouge). Les mitochondries de forme arrondie sont abondantes. Les couleurs n'ont aucune valeur mesurable et l'échelle de mesure en blanc est en μm .

Tirée de JACQUES et al., 2003b



changements de forme de la paroi du cœur et aux variations de pression hydrostatique survenant au cours du cycle cardiaque.

La forme des CEEs est maintenue par un cytosquelette constitué de filaments d'actine qui forment une bande d'actine périphérique. Cette bande est associée à la ceinture d'adhérence (zonula adherens) et participe à la régulation de la perméabilité entre les CEEs. Les filaments d'actine sont aussi organisés comme des fibres de stress qui jouent un rôle dans le maintien de l'endothélium en augmentant l'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire (SPORN *et al.*, 1989; PAGE *et al.*, 1992) et en renforçant la surface de la cellule (WHITE *et al.*, 1983). La littérature rapporte également chez ces cellules la présence de vimentine sous une forme sécrétée qui peut être reconnue spécifiquement par l'anticorps PAL-E. Le rôle précis de ce filament intermédiaire est toutefois encore inconnu au niveau de ces cellules (XU *et al.*, 2004).

L'EE est caractérisé par un chevauchement intercellulaire extensif et par la présence de fentes longues et profondes entre les cellules (MELAX et LEESON, 1967). Ces fentes sont recouvertes d'un glycocalyx chargé négativement qui pourrait contribuer à faire de l'EE une barrière hautement sélective pour la diffusion des molécules et qui permettrait la régulation du transport entre ces cellules (CLAUDE et GOODENOUGH, 1973; revue par BRUTSAERT *et al.*, 1996). Le transport paracellulaire est également limité par la présence de jonctions serrées (ou zonula occludens) qui ont une structure simple avec un ou deux points de contact (revue par BRUTSAERT *et al.*, 1996). Des points d'adhésion focaux entre les cellules et la matrice sont également présents pour permettre le transport trans-endothélial (revue

par BRUTSAERT, 2003). Il y a également de nombreuses jonctions de type Gap entre les CEEs formées de plusieurs types de connexines (Cx43, Cx40, Cx37) suggérant qu'il y a un couplage électrochimique intime entre ces cellules (revue par BRUTSAERT *et al.*, 1998). Ce type de communication permet une propagation électrochimique rapide entre les cellules de l'EE, et ce, même à la suite de la stimulation d'une seule cellule (BENY, 1999).

1.2.2 Rôle

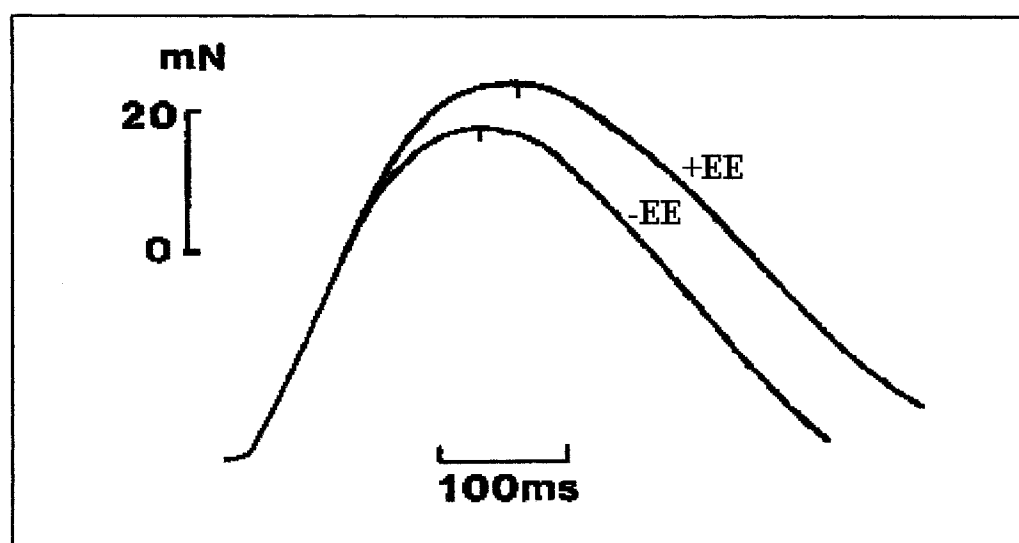
Brutsaert a publié en 2003 une revue mettant en évidence l'implication de l'endothélium endocardique dans la fonction cardiaque et l'importance de son interaction avec son environnement. Par la sécrétion de divers facteurs, les CEEs influencent la performance contractile, le rythme cardiaque et le développement/maturation du cœur et des CEEs elles-mêmes (BRUTSAERT, 2003).

En 1988, Brutsaert et ses collaborateurs ont été les premiers à démontrer l'influence des CEEs sur la performance contractile des muscles papillaires de chat en présence et en absence de l'EE. La figure 4 montre que la dénudation de l'EE du muscle papillaire provoque une diminution de la tension maximale et une abréviation de la durée de la contraction due à une relaxation précoce et ce, de manière immédiate et irréversible. Par contre, aucun changement significatif n'a été observé au niveau de la vitesse de contraction du muscle cardiaque (BRUTSAERT *et al.*, 1988).

Figure 4 Effet de l'endothélium endocardique sur la contraction isométrique du muscle cardiaque

Cette figure montre la force d'une contraction isométrique en fonction du temps en présence (+EE) et en absence (-EE) de l'endothélium endocardique au niveau du muscle papillaire du chat. La dénudation de l'EE induit une relaxation précoce et une diminution de la force contractile du muscle papillaire sans aucun changement dans la première phase de la contraction.

Modifiée de BRUTSAERT et al., 1988



Plusieurs évidences expérimentales ont par la suite confirmé la participation des CEEs dans la performance contractile du cœur montrant qu'une réponse inotrope négative de l'ANP (MEULEMANS *et al.*, 1988) et une réponse inotrope positive en réponse à une faible concentration de phényléphrine nécessite la présence d'un EE intact (MEULEMANS *et al.*, 1990a, 1990b).

1.2.3 Interaction entre l'endothélium endocardique et le myocarde

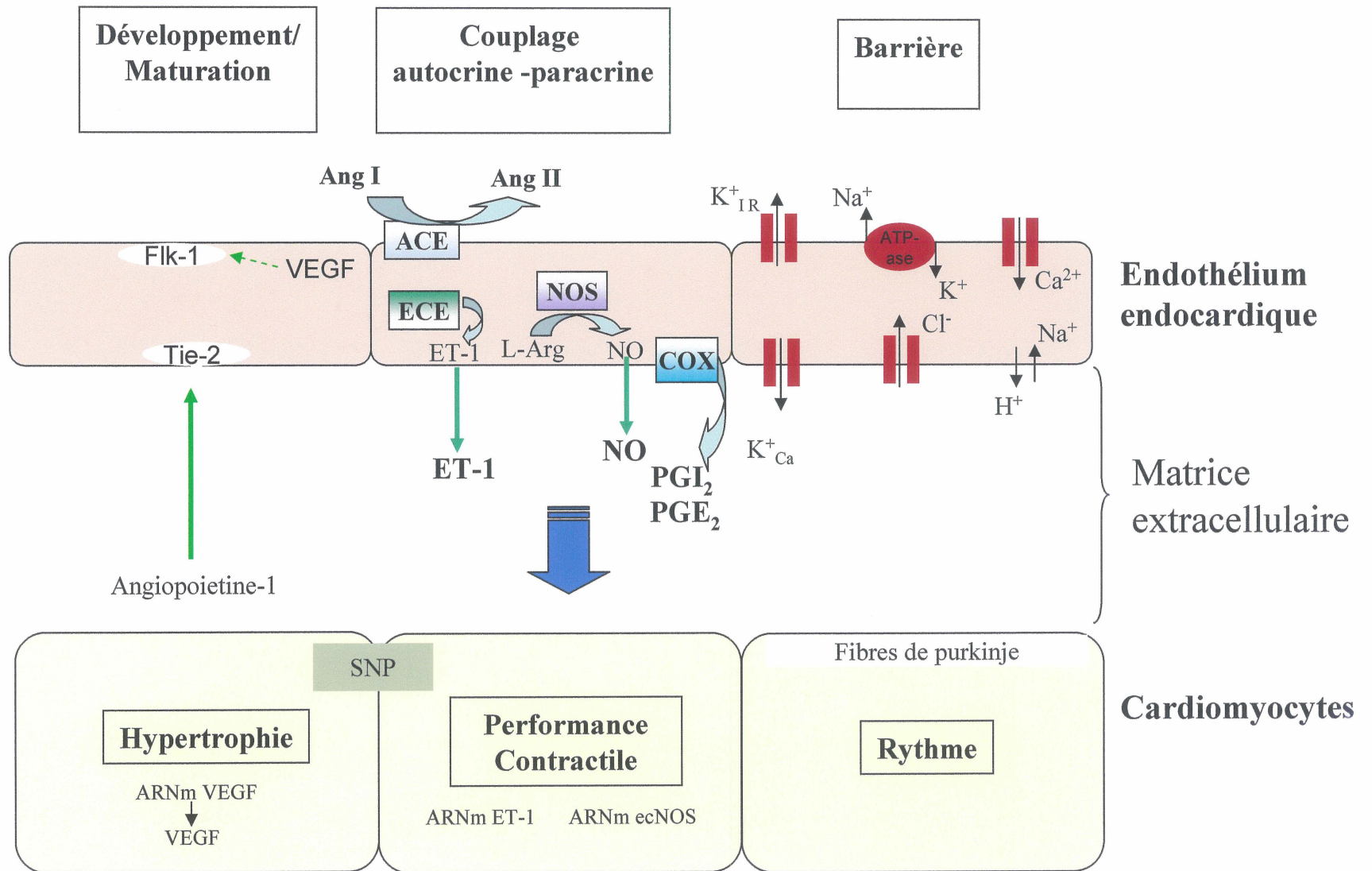
Les mécanismes de transduction du signal des CEEs aux cardiomyocytes sous-jacents ne sont pas encore bien connus. Cependant, Brutsaert et Andries ont proposé en 1992 deux mécanismes pouvant expliquer l'effet de l'EE sur la modulation de la performance cardiaque (Figure 5). Le premier suggère que l'EE peut relâcher, suite à des stimuli humoraux et physiques, des facteurs cardioactifs comme l'endothéline-1 (ET-1), le monoxyde d'azote (NO) et la prostaglandine I₂ (ou prostacycline, PGI₂) qui peuvent affecter la performance contractile, le rythme cardiaque, le métabolisme ainsi que la croissance du cœur. Il a été rapporté que les CEEs possèdent le récepteur Flk-1 du VEGF (LIAO *et al.*, 2000; SHALABY *et al.*, 1995) et le récepteur Tie-2 de l'angiopoïétine-1 (PURI *et al.*, 1999; SATO *et al.*, 1995; SURI *et al.*, 1996). Il est à noter que le VEGF et l'angiopoïétine-1 sont impliqués dans la différenciation et la prolifération des CEEs (FONG *et al.*, 1995; PURI *et al.*, 1999; SATO *et al.*, 1995; SURI *et al.*, 1996) ainsi que dans le développement cardiaque et le processus de trabéculatation du myocarde (MIQUEROL *et al.*, 1999; SUGISHITA *et al.*, 2000).

Figure 5 Interactions entre les cellules endothéliales endocardiques et les cardiomyocytes

L'endothélium endocardique (EE) produit des facteurs qui interagissent directement avec les cardiomyocytes sous-jacents et qui influencent la performance contractile, le rythme cardiaque ainsi que le développement et la maturation du cœur et des CEEs mêmes. Les CEEs agissent sur les cardiomyocytes par la libération de médiateurs cardioactifs tels l'ET-1, le NO et le PGI₂, en agissant aussi comme barrière sélective entre le sang et le cœur et en participant au processus de maturation des CEEs et du myocarde par l'action de divers facteurs de croissance comme le VEGF et l'angiopoïétine-1.

Modifiée de BRUTSAERT, 2003

Abréviations: ET-1, endothéline-1; ECE, enzyme de conversion de l'endothéline-1; L-Arg, L-arginine; NO, monoxyde d'azote; NOS, monoxyde d'azote synthase; PGI₂, prostacycline; PGE₂, prostaglandine E₂; COX, cyclooxygénase; Ang I et Ang II, angiotensine I et II; ACE, enzyme de conversion de l'Ang II; VEGF, facteur de croissance de l'endothélium vasculaire; Flk-1, récepteur du VEGF; Tie-2, récepteur de l'angiopoïétine-1; K⁺, potassium; Na⁺, sodium; Ca²⁺, calcium; Cl⁻, chlore; H⁺, hydrogène; VEGF ARNm, ARNm du VEGF, ET ARNm, ARNm de l'endothéline; ecNOS ARNm, ARNm de monoxyde d'azote synthase endothéliale; SNP, plexus nerveux sous-endothélial.



1.2.4 L'endothélium endocardique est une barrière physico-chimique

Le deuxième mécanisme proposé par Brutsaert et Andries pour expliquer l'effet de l'EE sur la modulation de la performance cardiaque est que l'EE peut jouer le rôle d'une barrière physico-chimique entre le sang circulant et le myocarde contrôlant ainsi la composition ionique du milieu interstitiel des cardiomyocytes (Figure 5; BRUTSAERT et ANDRIES, 1992). En effet, grâce à sa position unique entre le sang et les cardiomyocytes et à sa perméabilité sélective, l'EE peut réguler finement la composition ionique du liquide interstitiel entourant les cardiomyocytes (BRUTSAERT *et al.*, 1989; MOHAN *et al.*, 1995).

Des études électrophysiologiques ont démontré la présence sur la membrane de surface des CEEs, d'un grand nombre de canaux ioniques tels les canaux K^+ entrant retardés, les canaux K^+ activés par le Ca^{2+} , les canaux Cl^- activés par le volume ou mécano-sensibles, les canaux cationiques activés par l'étirement, les canaux calciques de type R et la pompe Na^+/K^+ ATPase (Figure 5; LASKEY *et al.*, 1990; HOYER *et al.*, 1994; FRANSEN *et al.*, 1995; MANABE *et al.*, 1995; JACQUES *et al.*, 2000a). Une asymétrie est observée dans la distribution des canaux ioniques sur la surface luminale par rapport à la surface abluminale des CEEs suggérant qu'il y a un transport net de K^+ du cœur vers le sang et de Na^+ du sang vers le liquide interstitiel des cardiomyocytes (BRUTSAERT *et al.*, 1998; MANABE *et al.*, 1995).

Plusieurs chercheurs ont fait une analogie entre la barrière hémato-encéphalique et la barrière sang-cœur de l'EE (GRANT *et al.*, 1998; RUBIN et STADDON, 1999; TAKATA *et al.*, 1997). Une caractéristique unique à la barrière hémato-encéphalique est sa haute résistance électrique trans-endothéliale 1500-2000 Ωcm^2) qui est beaucoup plus élevée que les autres barrières endothéliales (6-20 Ωcm^2) (BANNON *et al.*, 1995). En 1998, Brutsaert et ses collaborateurs ont rapporté que la résistance électrique trans-endothéliale des CEEs isolées de cœur de porc est de l'ordre de 50 à 60 Ωcm^2 , ces valeurs étant de 2 à 5 fois supérieures à ce qui est observé chez les autres barrières endothéliales suggérant que l'EE peut jouer le rôle de barrière active entre le sang et le milieu interstitiel des cardiomyocytes (BRUTSAERT *et al.*, 1998, 2003). Ces évidences montrent une fois de plus que l'EE contribue au maintien de l'homéostasie ionique dans le milieu interstitiel qui entoure les fibres de Purkinje et le plexus neuronal présents au niveau de la matrice extracellulaire (MARRON *et al.*, 1995).

1.2.5 Facteurs relâchés par l'endothélium endocardique

Les CEEs forment un système auto et paracrine pouvant exprimer et relâcher une variété d'agents qui influencent directement la performance contractile, le rythme cardiaque et le développement/maturation des myocytes cardiaques (Figure 5; BRUTSAERT, 2003). Dans le cœur adulte normal, les CEEs relâchent le NO (ANDRIES *et al.*, 1998; SHAH, 1996), l'ET-1 (MEBAZAA *et al.*, 1993a), la PGI_2 (MEBAZAA *et al.*, 1993b), la PGE_2 (MEBAZAA *et al.*, 1993b), les eicosanoïdes

(MEBAZAA *et al.*, 1993b), l'angiotensine II (Ang II) (PAUL et GANTEN, 1992), les adényl-purines (LIANG, 1992) et le neuropeptide Y (NPY) (JACQUES *et al.*, 2003b). Elles possèdent la monoxyde d'azote synthase constitutive (eNOS ou NOSIII) (SCHULZ *et al.*, 1991), l'enzyme de conversion de l'Ang II (ACE) (LANG *et al.*, 1996) et des activités kininases qui régulent les niveaux locaux de l'Ang II et de la bradykinine (BK) (SHAH *et al.*, 1996).

Dû au fait que le sujet de ce mémoire de maîtrise se concentre sur l'endothéline-1 et ses récepteurs, nous allons donc nous limiter, dans les sections suivantes, à ce qui est connu sur l'endothéline et ses récepteurs au niveau des CEEs.

1.3 L'endothéline

1.3.1 Découverte et structure de l'endothéline

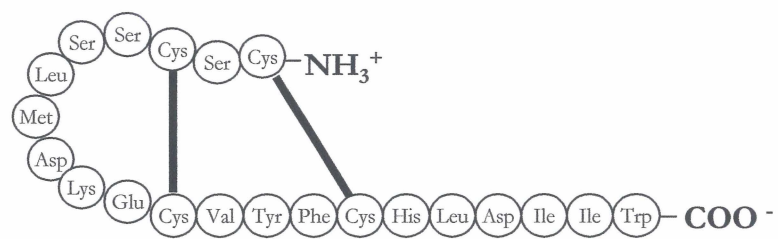
Depuis plus de 20 ans, plusieurs preuves ont contribué à appuyer l'implication dynamique de l'endothélium dans le maintien de l'homéostasie vasculaire. En 1985, Hickey et ses collaborateurs ont démontré l'existence d'un facteur vasoconstricteur dans le milieu de culture de cellules endothéliales bovines (HICKEY *et al.*, 1985). Suite à cette observation, Yanagisawa *et al.* en 1988 ont identifié ce facteur comme étant l'endothéline, et ce, à partir du surnageant de cellules endothéliales aortiques de porc en culture (YANAGISAWA *et al.*, 1988a).

L'endothéline (ET) est un des vasoconstricteurs les plus puissants connus à ce jour (MASAKI, 1998). Ce peptide de 21 acides aminés ayant une taille de 2492 Daltons contient dans sa structure deux ponts disulfures intramoléculaires entre les cystéines situées en position 1-15 et 3-11 (Figure 6) (YANAGISAWA *et al.*, 1988a, b). Des études menées par INOUE *et al.* en 1989 ont démontré que l'ET était le prototype d'une nouvelle famille constituée de trois isoformes, soient l'endothéline-1 (ET-1), l'ET-2 et l'ET-3 possédant des homologies de séquences mais étant codés par des gènes différents (Figure 6) (INOUE *et al.*, 1989). Ces peptides présentent une structure très similaire aux sarafotoxines, peptides isolés d'un venin de serpent qui possèdent des propriétés cardiotoxiques (KLOOG *et al.*, 1988; MASAKI, 1998; SOKOLOVSKY, 1992, 1994). Les isoformes de l'ET sont présents dans différents tissus et possèdent des actions biologiques diversifiées. L'ET-1 est la forme la plus puissante et la plus abondante retrouvée au niveau du système cardiovasculaire et plus particulièrement au niveau de l'endothélium des artères et veines coronaires humaines (GIAID *et al.*, 1995; SAETRUM OPGAARD *et al.*, 1994), au niveau des cardiomyocytes de porc (HEMSEN *et al.*, 1991; TØNNESSEN *et al.*, 1995) et des cellules endothéliales endocardiques humaines et de mouton (JACQUES *et al.*, 2005; DAVENPORT *et al.*, 1989). L'ET-2 est une forme de l'ET associée à la croissance et l'invasion tumorale du cancer du sein (GRIMSHAW *et al.*, 2002). Elle est également produite mais de façon limitée par les cellules endothéliales, le cœur et le rein (HOWARD *et al.*, 1992; PLUMPTON *et al.*, 1993). L'ET-3 est présent dans les systèmes endocrine, gastro-intestinal et nerveux central (GRAY et WEBB, 1996; MATSUMOTO *et al.*, 1989).

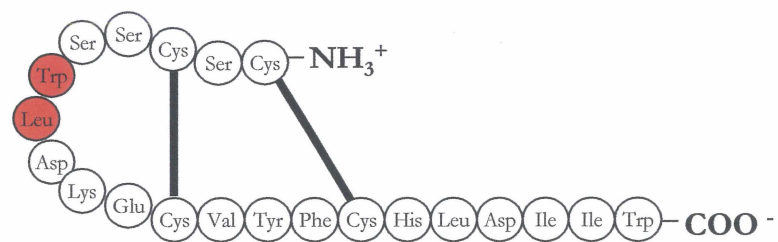
Figure 6 Structure des endothéline-1, -2 et -3 humaines

Les cercles rouges représentent les acides aminés de l'endothéline-2 et -3 qui diffèrent de ceux présents dans la structure de l'endothéline-1.

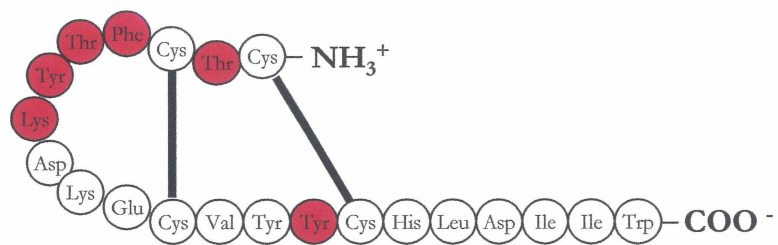
Modifiée de GRAY et WEBB, 1996



Endothéline-1



Endothéline-2



Endothéline-3

L'ET-1, notre peptide d'intérêt, est sécrétée principalement par les cellules endothéliales, mais aussi par les cardiomyocytes, les neurones et plusieurs autres types cellulaires issus de différents systèmes tels le rein, les poumons, le cerveau et le système immunitaire (GOTO, 2001; JACQUES *et al.*, 2005; LEE *et al.*, 1990; YANAGISAWA *et al.*, 1988a). L'ET-1 endogène peut être détectée dans la circulation d'un sujet sain à des concentrations de l'ordre du picomolaire (revue par BATTISTINI *et al.*, 1993). Il a été toutefois observé que cette concentration est plus élevée durant le développement fœtal (HAEGERSTRAND *et al.*, 1989) et dans plusieurs pathologies incluant l'ischémie-réperfusion (KARMAZYN, 1996).

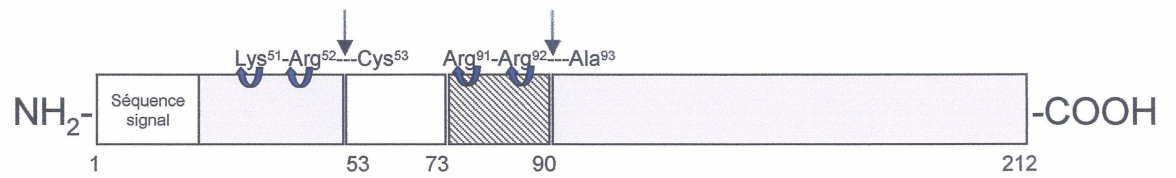
1.3.2 La biosynthèse de l'ET-1

Le produit initial du gène de l'ET-1 est une préproendothéline-1 constituée de 212 acides aminés (HAYNES et WEBB, 1998; SCHIFFRIN et TOUYZ, 1998). Il y a ensuite perte de la séquence signal de la prépro-ET-1 pour qu'elle soit sécrétée du noyau vers le cytoplasme. Par la suite, il y a un premier clivage protéolytique qui se fait au niveau des sites d'acides aminés dibasiques Lys⁵²-Arg⁵³ et Lys⁹⁰-Arg⁹¹ par une convertase de type subtilisine, la furine, combiné à l'action de carboxypeptidases pour générer la big-ET-1 de 38 acides aminés (GRAY et WEBB, 1996; DENAULT *et al.*, 1995; BLAIS *et al.*, 2002) (Figure 7). Le deuxième clivage fait intervenir l'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE), une métalloendopeptidase neutre, qui clive la big-ET-1 entre la Trp⁷³ et la Val⁷⁴ pour générer le peptide actif de 21 acides aminés,

Figure 7 Biosynthèse de l'ET-1

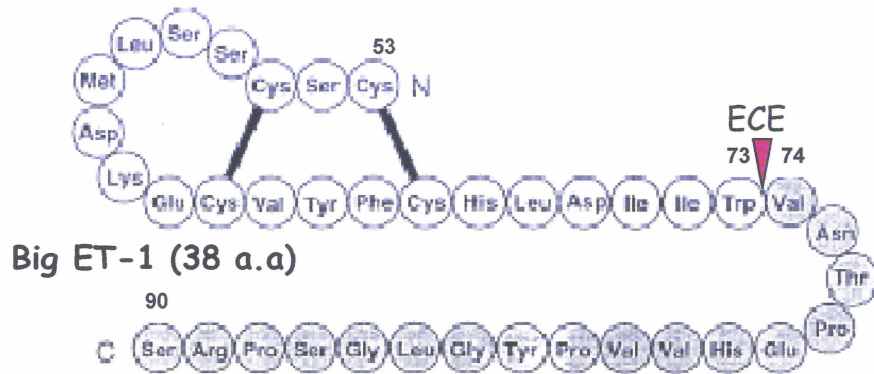
Le précurseur préproendothéline-1 subit un clivage protéolytique, par une endopeptidase spécifique aux acides aminés dibasiques (endopeptidase de type subtilisine, la furine), pour former la forme intermédiaire, la big-ET-1. Puis, l'enzyme de conversion de l'ET-1 (ECE) catalyse la conversion de la big-ET-1 pour produire l'ET-1 sous sa forme active.

Modifiée de GOTO et al., 1996



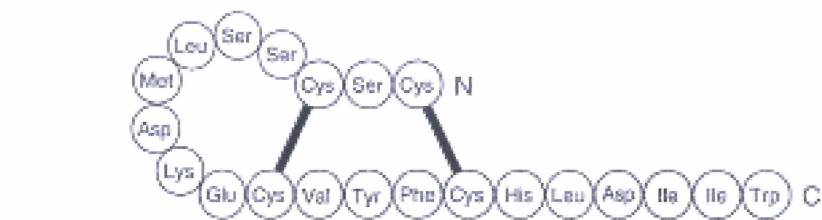
PréproET-1 (212 a.a)

↓ Endopeptidase dibasique (furine)
+
Carboxypeptidases



Big ET-1 (38 a.a)

↓ ECE



Endothéline-1 (21 a.a)

l'ET-1 (BRUNNER *et al.*, 2006; D'ORLÉANS-JUSTE *et al.*, 2003; HYNYNEN et KHALIL, 2006). Il est à noter que l'ET-2 et l'ET-3 sont également produites via une maturation spécifique de leur précurseur respectif, la big-ET-2 et la big-ET-3 (MASAKI, 1998).

L'ET-1 peut être générée en réponse à divers stimuli physique et chimique comme l'Ang II, des facteurs de croissance, le Transforming Growth Factor- β (TGF- β), l'interleukine-1, le Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α), la thrombine, l'hypoxie, les lipoprotéines et le stress mécanique (HAYNES et WEBB, 1998; MAEMURA *et al.*, 1992). Son expression peut être inhibée par des facteurs comme le NO, les peptides natriurétiques, les prostacyclines et l'héparine (SCHIFFRIN, 2005; KOUREMBANAS *et al.*, 1993; pour revue voir BRUNNER *et al.*, 2006).

1.4 Les récepteurs de l'endothéline

Les premières expériences sur l'endothéline menées par Yanagisawa et ses collaborateurs en 1988 ont démontré que l'administration intraveineuse d'ET-1 chez les rats provoquait une diminution transitoire de la pression sanguine suivie par une hypertension soutenue (YANAGISAWA *et al.*, 1988a). Ces réponses pharmacologiques opposées engendrées par l'ET-1 ont suggéré l'implication de différents mécanismes. Les études qui ont succédé ont permis d'observer deux types de réponses pharmacologiques face à l'endothéline. La première était une vasoconstriction (INOUE *et al.*, 1989; MAGGI *et al.*, 1990; pour revue voir

MIYAUCHI et MASAKI, 1999; GOTO *et al.*, 1996) tandis que la deuxième était une dilatation (WARNER *et al.*, 1989). Ces évidences ont donc suggéré la présence de deux types de récepteurs à l'ET-1, le récepteur ET_A et le récepteur ET_B, qui furent isolés et clonés (ARAI *et al.*, 1990; LIN *et al.*, 1991; HYNYNEN et KHALIL, 2006).

L'existence d'un troisième type de récepteur, ET_C, a été suggérée par WEBB (1991). Celui-ci a été cloné dans les mélanophores de la grenouille *Xenopus Leavis* (KARNE *et al.*, 1993; DAVENPORT, 2002). Il est à noter que récepteur ET_C n'est pas présent chez le mammifère.

Les récepteurs à l'endothéline appartiennent à la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires car ils sont caractérisés par la présence de sept segments traversant la membrane plasmique (MASAKI *et al.*, 1999; SOKOLOVSKY, 1995a, 1995b). Leurs actions sont relayées par l'activation d'une protéine G (revue par SCHIFFRIN et TOUYZ, 1998).

Les ETs se lient à leur récepteur avec une très haute affinité de l'ordre du nanomolaire; cette liaison est optimale et stable après 10 à 20 minutes à 37°C et la dissociation entre l'ET et son récepteur est très lente (revue par SCHIFFRIN et TOUYZ, 1998). Les récepteurs de l'endothéline peuvent être distingués selon leur affinité de liaison aux ligands (les trois isoformes d'ET et les agonistes ou antagonistes spécifiques) ainsi qu'à leur distribution tissulaire et cellulaire (D'ORLÉANS-JUSTE *et al.*, 1996) (tableau I).

**Tableau I Caractéristiques biochimiques et pharmacologiques des récepteurs
ET_A et ET_B**

ET-1: endothéline-1, ET-2: endothéline-2; ET-3: endothéline-3

Les antagonistes en caractères gras sont de nature non-peptidique et ont été utilisés pour les expériences.

Modifié de D'ORLÉANS-JUSTE et al., 1996

Caractéristiques	ET_A	ET_B
Acides aminés	427	442
Structure	7 domaines transmembranaires	7 domaines transmembranaires
Affinité aux ETs	ET-1 = ET-2 > ET-3	ET-1 = ET-2 = ET-3
Protéine G	Gq	Gq
Gène/chromosome	ETRA/4	ETRB/13
Agonistes sélectifs	-	IRL 1620 BQ3020
Antagonistes sélectifs	ABT-627 BQ123 PD156707	A-192621 BQ788 Ro468443

L'affinité du récepteur ET_A pour l'ET-1 et l'ET-2 est 100 fois plus grande que pour l'ET-3 alors que l'ET_B se lie avec la même affinité pour les trois isoformes (MASAKI, 1998; SCHNEIDER *et al.*, 2007). Chez l'humain, il existe une homologie de séquence en acides aminés d'environ 64% entre les récepteurs ET_A et ET_B (ADACHI *et al.*, 1991; SCHNEIDER *et al.*, 2007). Ces récepteurs possèdent dans leur structure un N-terminal extracellulaire, un C-terminal cytoplasmique et ont des sites de N-glycosylation, de palmitoylation permettant de les ancrer à la membrane ainsi que des résidus Sérine pouvant être phosphorylés par des kinases pour la régulation de leur activité après exposition à l'ET-1 (HIRATA *et al.*, 1988; ROUBERT *et al.*, 1991; WEBB *et al.*, 1998). Il a également été démontré que la palmitoylation est une modification importante pour ces récepteurs puisqu'elle peut favoriser leur inclusion ou exclusion des compartiments cellulaires (HORSTMAYER *et al.*, 1996; OKAMOTO *et al.*, 1997; QANBAR *et al.*, 2003).

1.4.1 ET-1 et voies de signalisation

Il a été démontré que la liaison de l'ET-1 à son récepteur au niveau de la membrane plasmique active une protéine G hétérotrimérique, probablement de type $\alpha_q/11$, qui peut être sensible ou non à la toxine de pertussis (PTX) (HILAL-DANDAN *et al.*, 1994; NEYLON, 1999) suggérant la possibilité de plusieurs mécanismes de signalisation menant à diverses actions biologiques. Par contre, des expériences effectuées sur des cellules COS-7 transfectées avec les récepteurs ET_A et ET_B respectivement (TAKIGAWA *et al.*, 1995) et ainsi que sur des cellules du muscle

lisse aortique de lapin (BKAILY *et al.*, 1998) ont démontré l'implication d'une protéine G sensible à la PTX et à la toxine du choléra (CTX) (pour plus de détails voir CHOUFANI, 2002).

La fixation de l'ET-1 à son récepteur engendre une cascade de signalisation intracellulaire. Deux types de signalisation ont été décrits pour l'ET-1:

- 1) une **signalisation à court terme**, caractérisée par le couplage excitation-contraction et/ou sécrétion (BKAILY *et al.*, 1997b);
- 2) une **signalisation à long terme** pouvant générer la croissance et la migration cellulaire (SANCHEZ *et al.*, 2002; SCHIFFRIN et TOUYZ, 1998; SOKOLOVSKY, 1995b).

Dans la signalisation à court terme, la liaison de l'ET-1 à son récepteur permet l'activation de la phospholipase C (PLC) par une protéine G causant l'hydrolyse de phosphatidylinositols en inositol-1,4,5-triphosphate (IP₃) et en diacylglycérol (DAG) (GRIENDLING *et al.*, 1989; SCHIFFRIN et TOUYZ, 1998). L'IP₃ formé provoque la libération des ions Ca²⁺ du réticulum endoplasmique (RE) et facilite l'entrée de plus de Ca²⁺ à partir du milieu extracellulaire via des canaux calciques de type L voltage-dépendants (MAGGI *et al.*, 1989; TURNER *et al.*, 1989; revue par RUBANYANI et POLOKOFF, 1994). Le DAG formé, quant à lui, active la protéine kinase C (PKC), une enzyme clé dans la régulation des fonctions cellulaires incluant la phosphorylation de plusieurs types de protéines comme le canal calcique de type L. Ceci favorise encore une fois un plus grand influx de Ca²⁺ à l'intérieur de la cellule (HE *et al.*, 2000). L'ET-1 augmente donc le taux de Ca²⁺ libre cytosolique

(EBIHARA *et al.*, 1996; pour plus de détails voir revue NAMBI *et al.*, 1995). De plus, des études menées par BKAILY et ses collaborateurs en 1998 ont démontré que l'ET-1 augmente la concentration de calcium libre intracellulaire ($[Ca^{2+}]_i$) dans les cellules aortiques de lapin via l'activation des canaux calciques de type R. Cette augmentation du $[Ca^{2+}]_i$ stimule la machinerie contractile intracellulaire ou induit la sécrétion dépendamment du type cellulaire (DE NUCCI *et al.*, 1988; NAMIKI *et al.*, 1992; pour plus de détails voir KANAIDE, 1996; MILLER *et al.*, 1993).

Dans la signalisation à long terme, l'ET-1 joue un rôle mitogène dans plusieurs types cellulaires telles les CEVs (DONG *et al.*, 2005) et les CMLVs (BOBIK *et al.*, 1990; BREUILLER-FOUCHE *et al.*, 1998) par l'activation des protéines kinases activées par les mitogènes (MAPKs). La liaison de l'ET-1 à son récepteur déclenche une série d'événements intracellulaires; soit l'activation successive de la protéine G, de la PLC, de la PKC, de la raf-1, de la MAP kinase kinase et de la MAPK (SCHIFFRIN et TOUYZ, 1998). Cette dernière est transloquée au noyau pour activer la transcription de plusieurs gènes cibles impliqués dans la prolifération cellulaire tels que les gènes des facteurs de transcription *c-myc* et *c-jun* (pour revue voir DOUGLAS et OHLSTEIN, 1997; GOTO *et al.*, 1996).

1.4.2 Le récepteur ET_A

Chez l'humain, le gène codant pour le récepteur ET_A est localisé sur le chromosome 4 et code pour une protéine de 427 acides aminés (pour plus de détails

voir HUNLEY et KON, 2001). Jusqu'à maintenant, aucun agoniste sélectif n'a été identifié, par contre, plusieurs antagonistes peptidiques tels que le BQ123 (IHARA *et al.*, 1992), le PD156707 (PATEL *et al.*, 1995) ainsi que non-peptidiques tels que le BMS-182874 (STEIN *et al.*, 1994; ELLIOTT *et al.*, 1994) et l'ABT-627 (VERHAAR *et al.*, 2000) ont été développés et sont sélectifs pour le récepteur ET_A (pour revue voir IQBAL *et al.*, 2005).

Dans le système cardiovasculaire, le récepteur ET_A est principalement présent dans les CMLVs où il relaie la vasoconstriction et la prolifération de ces cellules (HORI *et al.*, 1992; ALBERTS *et al.*, 1994; OHLSTEIN *et al.*, 1992). De nouvelles évidences ont démontré que l'ET-1 sécrétée par l'endothélium endocardique isolé du cœur de porc stimulait la prolifération des fibroblastes cardiaques via une voie de signalisation impliquant la PKC et les MAPK ainsi que la synthèse de collagène via l'activation du récepteur ET_A (KURUVILLA *et al.*, 2007). On retrouve aussi le récepteur ET_A dans les cardiomyocytes (ALLEN *et al.*, 2003) et les cellules endothéliales endocardiques humaines (JACQUES *et al.*, 2005). Des évidences ont démontré la présence de l'ARNm du récepteur ET_A dans le myocarde et l'endocarde humain (SAETRUM OPGAARD *et al.*, 2001). De plus, ce type de récepteur est présent au niveau des cellules endothéliales aortiques humaines (RIOPEL, 2006). La technique d'immunobuvardage de type western permet de détecter une bande immunoréactive de environ 34 kDa pour le récepteur ET_A dans plusieurs tissus du système cardiovasculaire comme le muscle lisse vasculaire (CHOUFANI, 2002),

l'endothélium endocardique (DESCORBETH, 2003) et l'endothélium vasculaire (RIOPEL, 2006).

La régulation de la production des récepteurs à l'ET se fait en parallèle aux niveaux d'ET (LEVIN, 1995). Des études démontrent que l'hypoxie stimule la production d'ET-1 et du récepteur ET_A au niveau des cellules endothéliales et du muscle lisse vasculaire respectivement (SIMONSON, 1993). D'autres études démontrent également que l'insuline ainsi que le monoxyde d'azote augmentent l'expression du récepteur ET_A dans les cellules du muscle lisse vasculaire (CMLVs) (FRANK *et al.*, 1993; REDMOND *et al.*, 1996). De plus, dans certains tissus, les facteurs de croissance et l'AMPc augmentent l'expression du récepteur ET_A tandis que l'Ang II diminue son expression (LEVIN, 1995).

1.4.3 Le récepteur ET_B

Chez l'humain, le gène codant pour le récepteur ET_B est localisé sur le chromosome 13 et code pour une protéine de 442 acides aminés (ARAI *et al.*, 1993). Plusieurs agonistes sélectifs du récepteur ET_B ont été développés comme par exemple, l'IRL-1620 (TAKAI *et al.*, 1992) et le BQ-3020 (IHARA *et al.*, 1992). De plus, divers antagonistes peptidiques sélectifs ont été développés comme le BQ-788 (ISHIKAWA *et al.*, 1994) et ainsi que non-peptidiques tel que le Ro468443 et le A-192621 (DE GOTTARDI *et al.*, 2000; HYNYNEN et KHALIL, 2006) (tableau I).

Au niveau du système cardiovasculaire, plusieurs études démontrent que le récepteur ET_B est principalement présent au niveau des cellules endothéliales vasculaires (HAGIWARA *et al.*, 1993; GHONEIM *et al.*, 1993; TAKAYANAGI *et al.*, 1991) et des CMLVs où il relaie la vasodilatation (DAI *et al.*, 2004; TOSTES *et al.*, 2002; BKAILY *et al.*, 2003a). Le récepteur ET_B est aussi présent au niveau des cellules endothéliales endocardiques humaines (SAETRUM OPGAARD *et al.*, 2001; JACQUES *et al.*, 2005) et au niveau des cardiomyocytes humains (ALLEN *et al.*, 2003).

L'activation du récepteur ET_B stimule la relâche de NO et de prostaglandine, deux agents vasodilatateurs (WARNER *et al.*, 1989; HIRATA *et al.*, 1993; LAVALLEE et THORIN, 2003; SCHIFFRIN, 2005; BEGHETTI *et al.*, 2005). Le récepteur ET_B prévient l'apoptose (SHICHIRI *et al.*, 1997, 1998; FILIPPATOS *et al.*, 2001; DONG *et al.*, 2005) et inhibe l'expression de l'ECE-1 au niveau des CEs de rat (NAOMI *et al.*, 1998). Le récepteur ET_B a également un rôle important dans la clairance de l'ET-1 circulant (HONORÉ *et al.*, 2005; FUKURODA *et al.*, 1994).

Basé sur des évidences pharmacologiques, le récepteur ET_B peut être classifié en deux sous-types: ET_{B1}; situé sur les CEs, relaie la vasodilatation par la relâche de NO (DOUGLAS *et al.*, 1995; SAKAMOTO *et al.*, 1991; SAKURAI *et al.*, 1990; SOKOLOVSKY *et al.*, 1992; MIZUGUCHI *et al.*, 1997), et ET_{B2}, situé sur les CMLVs, relaie la vasoconstriction (SUDJARWO *et al.*, 1993; BIGAUD et PELTON, 1992; CRISTOL *et al.*, 1993). Cependant, au point de vue moléculaire, ces deux sous-types de récepteurs ne sont pas des entités distinctes (CLOZEL et GRAY, 1995). Les différences pharmacologiques observées entre les deux sous-types pourraient être

dues à des différences interespèces ou à des modifications post-traductionnelles comme la glycosylation, qui serait différente en fonction de la localisation tissulaire de ceux-ci (CLOZEL et GRAY, 1995; pour plus de détails voir CHOUFANI, 2002). Au niveau des CEs, il a été rapporté que le TNF- α et le facteur de croissance fibroblastique basique (b-FGF) augmentent l'expression du récepteur ET_B (SMITH *et al.*, 1998) tandis que l'AMPc et les catécholamines en diminuent l'expression (LEVIN, 1995; KEDZIERSKI *et al.*, 2001).

1.4.4 Présence de récepteurs couplés aux protéines G dans le noyau

Plusieurs récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs) détectés au noyau par diverses techniques ont été répertoriés (pour revue voir GOBEIL Jr. *et al.*, 2006). Le concept de RCPG au noyau a fait sa première apparition il y a un peu plus de 20 ans avec la détection de sites de liaison à l'Ang II par radioliation sur des noyaux de rate et de foie de rat (RE *et al.*, 1981). Suite à cela, des études menées en 1992 ont pu démontrer une différence d'affinité de l'Ang II pour les récepteurs nucléaires par rapport à ceux de la membrane plasmique (BOOZ *et al.*, 1992; TANG *et al.*, 1992). Des études subséquentes ont pu attribuer une fonctionnalité aux récepteurs présents au niveau des membranes de noyaux isolés de foie de rat et ont pu démontrer que leur stimulation à l'Ang II induisait la transcription de l'ARNm de la rénine et de l'angiotensinogène (EGGENA *et al.*, 1993). Une séquence de localisation nucléaire (SLN) dans la queue cytoplasmique du récepteur AT₁ a été identifiée par le groupe de

LU en 1998 et ceci pourrait expliquer le phénomène de translocation nucléaire pouvant être observé suite à l'internalisation du récepteur induit par l'Ang II au niveau des cellules CHO (CHEN *et al.*, 2000) et des CMLVs aortiques humaines. Cependant, le groupe de Lu (1998) a également démontré que le récepteur AT₂ ne transloquait pas au noyau après stimulation à l'Ang II. De plus, il a été démontré que ce récepteur ne possédait pas de SLN (KAMBAYASHI *et al.*, 1993; NAKAJIMA *et al.*, 1993). Des évidences ont également montré la présence de l'Ang II et de ses deux récepteurs AT₁ et AT₂ au niveau nucléaire des CEVs isolées de l'aorte humaine (KAMAL, 2003) et des CEEs (JACQUES *et al.*, 2003a, 2006b). Récemment, leur présence a été rapportée au niveau des noyaux isolés dans les CMLVs et hépatocytes humains, de lapin et de rat. Il a également été démontré que l'Ang II pouvait induire une augmentation transitoire du $[Ca^{2+}]_n$ avec une cinétique dépendante de l'espèce (NADER, 2005).

En 1992, HOCHER et ses collaborateurs ont démontré pour la première fois la présence de sites de liaison à l'ET-1 dans les noyaux isolés d'hépatocytes de rat (HOCHER *et al.*, 1992). De plus, par l'utilisation d'une sonde fluorescente couplée à l'ET-1, le groupe de BKAILY a mis en évidence la présence des récepteurs à l'ET-1 non seulement au niveau de la membrane plasmique mais également au niveau des membranes de l'enveloppe nucléaire et le nucléoplasme des cellules cardiaques et des cellules du muscle lisse vasculaire humain (BKAILY *et al.*, 1997b, 1997c; 2000; 2002; 2003a). De façon très intéressante, par l'utilisation de la méthode de perforation de la membrane plasmique, le groupe de BKAILY *et al.* a démontré que ces récepteurs étaient fonctionnels car l'administration cytosolique d'ET-1 au niveau

de ces cellules pouvait induire une augmentation concentration-dépendante du $[Ca^{2+}]_n$. Ils ont aussi démontré que les récepteurs à l'ET-1 présents au niveau de la membrane plasmique étaient moins sensibles à l'ET-1 que les récepteurs à l'ET-1 présents au niveau des membranes de l'enveloppe nucléaire de ces cellules (BKAILY *et al.*, 2000, 2002). L'équipe de BOIVIN et de ses collaborateurs (2003) ont également identifié ces récepteurs au niveau des membranes de l'enveloppe nucléaire des cardiomyocytes de rat (BOIVIN *et al.*, 2003). De plus, la présence de récepteurs ET_A et ET_B fonctionnels au niveau des noyaux isolés de cellules hépatiques et de CMLVs humain, de lapin et de rat a récemment été démontrée (NADER, 2005).

La présence des récepteurs à la prostaglandine E₂ (PGE₂) fonctionnels a été démontrée dans divers types de cellules et de tissus en utilisant de multiples approches comme la radiolisation, l'immunofluorescence indirecte combinée à la microscopie confocale et des tests calciques de fonctionnalité (BHATTACHARYA *et al.*, 1998; 1999; GOBEIL Jr. *et al.*, 2002). De plus, il a été possible d'identifier avec précision à l'aide de la microscopie électronique à haute résolution la distribution des récepteurs au niveau des membranes interne et externe du noyau. De façon intéressante, GOBEIL Jr. *et al.* (2002) a démontré que le sous-type EP₃ des récepteurs à la PGE₂ présent au niveau des membranes de l'enveloppe nucléaire n'a pas la même fonction que ceux présents au niveau de la membrane plasmique. En effet, les récepteurs EP₃ de la membrane plasmique, via leur couplage à une protéine Gi ou Go, affecte la mobilisation du Ca²⁺ par la production d'AMPc ou d'IP₃ tandis que les récepteurs nucléaires vont générer une réponse qui affectera la transcription de gène tel que

eNOS. La voie de signalisation sollicitée a été caractérisée par le couplage à un canal K^+ dépendant du Ca^{2+} retrouvé au niveau de la membrane nucléaire, la stimulation des voies PI-3 kinase/AKT et ERK-MAPK ainsi que l'implication de NF κ B (GOBEIL Jr. *et al.*, 2002).

Lee *et al.* (2004) ont démontré la présence constitutive des récepteurs à l'apeline, des récepteurs AT₁ de l'Ang II ainsi que des récepteurs B₂ de la BK au niveau nucléaire des cellules de cerveau humain et de cellules surexprimant ces récepteurs (LEE *et al.*, 2004). Ces auteurs ont rapporté l'existence de motifs de SLN positionnées différemment dans la séquence de ces récepteurs suggérant qu'il peut y avoir différents mécanismes permettant le transport de ces derniers au noyau (LEE *et al.*, 2004).

La présence de NPY et de son récepteur Y₁ a été démontrée non seulement au niveau cytosolique mais également au niveau du nucléoplasme des CEEs isolées de cœurs fœtaux humains de 20 semaines. Un fait intéressant était que la distribution était particulièrement importante au niveau de l'espace périnucléaire (JACQUES *et al.*, 2003b). Par la suite, les études de PERREAULT (2004) ont mis en évidence la présence d'un autre type de récepteur au NPY, toujours couplé aux protéines G, le récepteur Y₂, au niveau nucléaire des CEEGs et des CEEDs. Ses études ont également démontré leur fonction au niveau de la modulation du calcium nucléoplasmique suite à une stimulation par le NPY. De façon très intéressante, elle a pu démontrer que les récepteurs présents au niveau nucléaire étaient plus sensibles

que ceux présents au niveau de la membrane plasmique de ces cellules (SADER, 2002; PERREAULT, 2004; revue par JACQUES *et al.*, 2006a).

1.5 Le noyau

Le noyau, de sa perspective classique, s'est longtemps défini comme un organe cellulaire comprenant une enveloppe nucléaire formée de deux doubles membranes phospholipidiques englobant le matériel génétique des cellules eucaryotes (PALAY et PALADE, 1955). Aujourd'hui, de plus en plus d'évidences supportent l'implication du noyau dans le couplage excitation-contraction et sécrétion des cellules excitables et non-excitables comme les CMLVs, les cardiomyocytes et les cellules endothéliales (BKAILY *et al.*, 1996; 1997b; 2004). De plus, un nouveau rôle lui a été attribué au niveau de la synthèse protéique (IBORRA *et al.*, 2001; HENTZE *et al.*, 2001). Le noyau comprend également divers éléments et protéines de signalisation, comme des RCPGs, des protéines G (SAFFITZ *et al.*, 1994; BALDASSARE *et al.*, 1997; CROUCH et SIMSON, 1997), des canaux ioniques (GERASIMENKO *et al.*, 1996; BKAILY, 1994b; BKAILY *et al.*, 2003c, 2006), des échangeurs (XIE *et al.*, 2002; BKAILY *et al.*, 2004, 2006), des pompes (BKAILY *et al.*, 2003c), des enzymes (PLA₂, PLC, PLD et adénylate cyclase) (SCHIEVELLA *et al.*, 1995; D'SANTOS *et al.*, 1998; MALVIYA et ROGUE, 1998; YAMAMOTO *et al.*, 1998) ce qui a permis l'élaboration d'un nouveau concept: « le noyau est une cellule à l'intérieur de la cellule » (revue par BKAILY *et al.*, 2003c; revue par MAZZANTI *et al.*, 2001).

La synthèse protéique nucléaire est également un concept qui peut expliquer la présence de RCPGs au niveau du noyau des cellules. En effet, plusieurs indications de l'existence des machineries transcriptionnelle et traductionnelle ont été rapportées dans le noyau; comme le facteur transcriptionnel eIF-4E (LEJBKOWICZ *et al.*, 1992), l'amino-acétylation des ARNts au niveau nucléaire avant leur exportation au cytoplasme (LUND et DAHLBERG, 1998) et la présence de deux mécanismes distincts pour l'exportation des pré-ARNts et des ARNts matures du noyau (ARTS *et al.*, 1998; pour plus de détails voir NADER, 2005). De plus, il a été démontré que le couplage de la transcription et de la traduction est possible dans les noyaux isolés de cellules de mammifères et que ce couplage pourrait contribuer pour 10 à 15% de la production protéique totale de la cellule. Cette synthèse peut être atténuée par des agents comme la cycloheximide ou la puromycine (IBORRA *et al.*, 2001; HENTZE, 2001).

1.6 Le calcium

Le second messager le plus répandu au niveau des cellules eucaryotes est le calcium (SCHWARTZ, 1990; SPEDDING et PAOLETTI, 1992). Ce dernier joue un rôle critique dans la régulation de fonctions cellulaires comme la sécrétion, la contraction, le métabolisme, la transcription de gènes et l'apoptose (BERRIDGE *et al.*, 2003; CLAPHAM, 1995). En effet, il a été démontré comme un élément essentiel dans le couplage de l'excitation-sécrétion des cellules sécrétrices comme les CEs

(pour revue voir NILIUS et DROOGMANS, 2001) ainsi que dans l'excitation-contraction des cellules contractiles comme les cardiomyocytes et les CMLVs (BOLTON, 1979; BKAILY, 1994c; BKAILY *et al.*, 1996, 1997a, 2000). De plus, la synthèse et/ou relâche de pro- et anti-coagulants, de facteurs de croissance et de composés vasoactifs comme le NO et la PGI₂ par les CEVs dépendent ou peuvent être modulés par la variation du [Ca²⁺]_i (BUSSE *et al.*, 1991; INAGAMI *et al.*, 1995; NILIUS *et al.*, 1997; GOMES *et al.*, 2006). Par exemple, la production de NO par la eNOS résulte de l'activation d'une voie Ca²⁺/calmoduline (CaM) dépendante, ce qui nécessite un influx calcique à travers la membrane plasmique (GRAIER *et al.*, 1992; IOUZALEN *et al.*, 1996; LANTOINE *et al.*, 1998). Plusieurs facteurs tels l'ET-1 dans les CE agissent sur leurs cellules cibles en augmentant le [Ca²⁺]_i de celles-ci (TRAN *et al.*, 2000). Cette augmentation du [Ca²⁺]_i provient dans certains cas d'une libération du calcium des réserves calciques intracellulaires tels le réticulum endoplasmique (RE), via l'activation de canaux calciques inositol triphosphate (IP₃) ou ryanodine-dépendants (pour plus de détails voir TRAN *et al.*, 2000; KAWANABE et NAULI, 2005; GOMES *et al.*, 2006).

Au niveau du noyau, l'espace périnucléaire est en continuité avec le lumen du RE (MALVIYA et ROGUE, 1998). Plusieurs études ont démontré que le noyau est capable d'emmagasinier le Ca²⁺ et qu'il pourrait participer activement à l'homéostasie calcique (ABRENICA *et al.*, 2003; BKAILY *et al.*, 1997b, 1996, 2002; GILCHRIST *et al.*, 2003). Différentes protéines impliquées dans le transport actif du Ca²⁺ se trouvent effectivement au niveau des membranes de l'enveloppe nucléaire comme la pompe Ca²⁺-ATPase (BKAILY *et al.*, 1997a, 1997b, 1999; LANINI *et al.*, 1992), le

canal calcique sensible à l'IP₃ (MALVIYA, 1994; GERASIMENKO *et al.*, 1995) et le canal calcique de type R étant responsable de l'influx calcique du cytoplasme vers le noyau (BKAILY *et al.*, 1994a, 1997b). La présence de ces différents mécanismes de transport suggère que celui-ci joue un rôle important au niveau du noyau dans le couplage excitation-sécrétion et/ou contraction des cellules (BKAILY *et al.*, 1996, 1997b, 2004). Il a également été rapporté que le calcium nucléaire joue des rôles importants au niveau de la transcription de gènes, la synthèse et la réparation de l'ADN et le transport de protéines (MALVIYA et ROGUE, 1998)

1.6.1 Les canaux calciques dans les cellules endothéliales endocardiques

Plusieurs types de canaux calciques voltage-dépendants (VOCCs) ont été rapportés dans la littérature. Ceux-ci se distinguent par leurs caractéristiques d'ouverture et de fermeture ainsi que par leur seuil d'activation et leur distribution tissulaire (HOSEY et LAZDUNSKI, 1988; SPEDDING et PAOLETTI, 1992; BKAILY *et al.*, 1992, 1993, 1994a, 1997b; TRIGGLE, 1999; FISHER et BOURQUE, 2001; CATTERALL, 2005). Il y existe 6 types de canaux calciques soient les canaux calciques de type P/Q, N, R (Résistant aux bloqueurs de canaux calciques connus), L, T et R (Repos) (BKAILY *et al.*, 1992, 1993, 1994a, 1997b, 2005; TRIGGLE, 1999; FISHER et BOURQUE, 2001).

Le canal calcique de type R, découvert en 1971 par BAKER et ses collaborateurs, a été baptisé canal calcique de potentiel de repos par DIPOLO en 1979. Ce canal permet l'entrée passive de Ca²⁺ dans la cellule pendant une

dépolarisation membranaire de longue durée. Plusieurs études ont démontré l'implication de ce canal dans le maintien du tonus de base du muscle lisse vasculaire (BKAILY *et al.*, 1991) ainsi que dans l'augmentation soutenue du $[Ca^{2+}]_i$ durant la contraction soutenue du muscle lisse en réponse à différents agents vasoactifs proinflammatoires (BKAILY *et al.*, 1992, 1993, 1994c, 1994d; BENCHEKROUN *et al.*, 1995). D'autre part, ces canaux semblent être impliqués dans les phénomènes de sécrétion basale au niveau de l'endothélium vasculaire (BKAILY *et al.*, 1992, 1993, 1997b). Notons que plusieurs facteurs endothéliaux, comme l'ET-1, ont été rapporté comme pouvant augmenter le $[Ca^{2+}]_i$ via l'activation du canal calcique de type R (BKAILY *et al.*, 1997a, 1997b, 1998).

Dans les cellules endothéliales, il n'y a pas de canal calcique de type P, N, Q, R (résistant), L ou T (TAKEDA *et al.*, 1987; NILIUS et RIEMANN, 1990; pour plus de détails voir TAKEDA et KLEPPER, 1990). Cependant, des évidences ont montré la présence de canaux calciques de type R (repos) dans ces cellules (BKAILY *et al.*, 1992, 1993, 1997a, 1997b, 1998; JACQUES *et al.*, 2000b, 2003b).

1.7 L'ET-1 peut induire l'internalisation de ses récepteurs

Tel que mentionné précédemment, l'ET-1 a une très forte affinité pour ses récepteurs ET_A et ET_B. Effectivement, des études *in vitro* effectuées sur différents tissus démontrent que cette liaison possède une demi-vie de dissociation supérieure à 30 heures (WAGGONER *et al.*, 1992). Également, nous avons vu dans les sections

précédentes que la liaison de l'ET-1 à ses récepteurs menait à l'activation d'une protéine G engendrant des actions physiologiques diverses telles que la vasoconstriction des CMLVs via ET_A et la vasodilatation NO-dépendante via ET_B au niveau des CEVs (MARSAULT *et al.*, 1993; BKAILY *et al.*, 1994a; YANAGISAWA et MASAKI, 1989).

De nombreuses études ont tenté d'éclaircir les mécanismes menant à la divergence des réponses générées par ces deux récepteurs. Ces études ont considéré une propriété particulière que possèdent les récepteurs qui sont couplés à une protéine G (RCPGs), l'internalisation (SCOTT *et al.*, 2004). Ce phénomène a effectivement été observé pour plusieurs types de RCPGs comme les récepteurs AT₁ de l'Ang II (BKAILY *et al.*, 2003b; BOOZ *et al.*, 1992; LU *et al.*, 1998; CHEN *et al.*, 2000), les récepteurs muscariniques de l'acétylcholine (Ach) (LEE *et al.*, 1998) et les récepteurs β_2 -adrénergiques (VON ZASTROW *et al.*, 1992; PIPPIG *et al.*, 1995).

L'internalisation est définie comme un mode de désensibilisation du récepteur; c'est-à-dire la perte progressive de sa réponse face à une stimulation répétée de son agoniste (revue par FERGUSON, 2001; revue par SCOTT *et al.*, 2004). Deux phénomènes ont été décrits pour les récepteurs qui s'internalisent: le recyclage et la dégradation.

Plusieurs études ont tenté d'étudier l'internalisation des récepteurs ET_A et ET_B. Le groupe de CHUN (1994) a montré que le récepteur ET_A lié à son ligand co-immunoprécipite avec la cavéoline (protéine structurale des caveolae qui forment des

invaginations membranaires) au niveau des cellules COS. Ils ont également observé une co-localisation du récepteur ET_A avec la cavéoline en absence d'ET-1 sous forme d'agrégats au niveau et sous-jacents à la membrane plasmique (CHUN *et al.*, 1994). Ce même groupe a plus tard rapporté que l'ET-1 demeure intact et lié au récepteur ET_A jusqu'à 2 heures suivant son internalisation au niveau des cellules de l'ovaire du hamster chinois (CHO) (CHUN *et al.*, 1995).

Par contre, des études menées par OKSCHE *et al.* (2000) ont démontré que le récepteur ET_B s'internalise dans des vésicules de clathrine dans les cellules CHO. Ce phénomène est suivi d'une réapparition du récepteur au niveau de la membrane plasmique, qui serait due à une synthèse protéique *de novo*. Ce groupe a aussi observé que le récepteur ET_B n'était presque pas recyclé (OKSCHE *et al.*, 2000).

ABE *et al.* en 2000 ont étudié la localisation ainsi que le trafic transcellulaire des récepteurs à l'ET-1 dans plusieurs lignées cellulaires transfectées avec le récepteur ET_A lié à la protéine fluorescente verte (GFP) et/ou avec le récepteur ET_B lié à la GFP. Ils ont montré que les récepteurs ET_A sont présents de façon prédominante au niveau de la membrane plasmique alors que les récepteurs ET_B sont présents dans des vésicules intracellulaires formées de la protéine membranaire associée aux lysosomes-1 (LAMP-1). Des expériences subséquentes sur des cellules de souris L manquant la thymidine kinase (L tk-) transfectées avec le récepteur ET_B lié à la GFP ont démontré que le traitement à la Bafilomycine A₁, un inhibiteur de la H⁺ ATPase vacuolaire, induisait une diminution significative de la dégradation du récepteur ET_B et non du récepteur ET_A, suggérant que le récepteur ET_B est dirigé aux lysosomes et y

est dégradé par des protéases lysosomales. Par la suite, ils ont construit des récepteurs ET_A et ET_B chimériques où les queues cytoplasmiques ont été échangées et ont observé que les récepteurs ET_A possédant la queue cytoplasmique du récepteur ET_B se retrouvent à la membrane plasmique ainsi que dans des vésicules intracellulaires et qu'ils sont fortement dégradés. Par contre, les récepteurs ET_B possédant la queue cytoplasmique du récepteur ET_A sont localisés surtout au niveau de la membrane plasmique et sont très peu dégradés contrairement à ce qui est observé pour les récepteurs de type sauvage (ABE *et al.*, 2000). De plus, une délétion de la queue cytoplasmique des deux récepteurs mène à une localisation de ceux-ci dans les vésicules intracellulaires suivie d'une dégradation. Les résultats obtenus ont suggéré que le récepteur ET_A possède dans sa queue C-terminale cytoplasmique un signal qui serait responsable de son ancrage dans la membrane plasmique (ABE *et al.*, 2000).

Par la suite, PAASCHE *et al.* (2001) ont démontré par la construction de récepteurs chimériques où les queues cytoplasmiques des récepteurs ET_A et ET_B sont échangés et par la troncation des résidus carboxyterminaux de ces récepteurs que la queue du récepteur ET_B permet une internalisation plus rapide de ce récepteur et que la queue cytoplasmique du récepteur ET_A permet le ciblage du récepteur à la voie de recyclage (PAASCHE *et al.*, 2001). Plusieurs études ont suivies et ont montré l'importance de la queue cytoplasmique présente au niveau de certains récepteurs tels le récepteur à la Substance P (TREJO et COUGHLIN, 1999), le récepteur à la lutropine (HIRAKAWA *et al.*, 2003) et les récepteurs aux opioïdes (TANOWITZ et VON ZASTROW, 2003) pour leur ciblage à la voie de recyclage. De plus,

PAASCHE et ses collaborateurs, en 2005, ont démontré que la queue cytoplasmique du récepteur ET_A contenait un motif ayant la structure et les caractéristiques d'un ligand PDZ « postsynaptic density-95/disc-large/zona occludens » interne qui serait important pour son ciblage et qui n'est pas présent au niveau de la queue cytoplasmique du récepteur ET_B (PAASCHE *et al.*, 2005).

BREMNES *et al.* (2000) ont montré que les récepteurs ET_A et ET_B s'internalisent rapidement suite à leur stimulation avec l'ET-1 dans les cellules COS. Ils ont démontré que le processus d'internalisation dépend de la kinase des récepteurs couplés aux protéines G (GRK), de l'arrestine, de la dynamine et de la clathrine. Ils ont également montré que les récepteurs ET_A et ET_B internalisés sont dirigés aux endosomes précoces co-localisant avec la protéine Rab5, une petite GTPase régulant le mouvement et la fusion des vésicules avec les endosomes précoces et la formation de ces vésicules à la surface cellulaire, et il semble qu'à partir de cette position, chaque récepteur se dirige vers une voie particulière (BREMNES *et al.*, 2000). Les récepteurs ET_A sont dirigés vers un compartiment de recyclage péracentriolaire et co-localisent avec la transferrine (marqueur de recyclage). Par la suite, ils réapparaissent à la membrane de surface. Par contre, ils ont observé que les récepteurs ET_B s'internalisent de façon constitutive, et ce, sans nécessairement être liés à leur ligand, et qu'ils se dirigent vers des endosomes tardifs contenant la LAMP-2 (marqueur lysosomal) pour ensuite être dégradés aux lysosomes (BREMNES *et al.*, 2000). Ces résultats sont en accord avec le groupe de ABE *et al.* (2000) qui ont conclu que le récepteur ET_B possédait en sa queue cytoplasmique une séquence permettant son

ciblage aux lysosomes. Dans le même ordre d'idée, OAKLEY et ses collaborateurs (1999) ont démontré qu'un motif sérine au niveau de la queue cytoplasmique des RCPGs serait à l'origine de leur forte affinité pour les arrestines et leur ciblage subséquent aux lysosomes (OAKLEY *et al.*, 1999).

YAMAGUCHI et ses collaborateurs (2003) ont apporté de nouvelles évidences qui suggèrent que le récepteur ET_B pouvait interagir avec la cavéoline-1 (CAV-1) en absence d'ET-1 dans les cellules Sf9 d'une lignée d'insectes, les cellules COS-1 et HEK-293 (YAMAGUCHI *et al.*, 2003). Il a été démontré la présence de plusieurs protéines relayant la signalisation intracellulaire calcique dans les caveolae telles que la PKC, la petite GTPase Ha-Ras, différentes sous-unités α des protéines G ainsi que des tyrosine kinases de la famille Src (OKAMOTO *et al.*, 1998). En se basant sur ces évidences, YAMAGUCHI et ses collaborateurs ont suggéré que les caveolae pourraient être impliquées dans la réception, la concentration et la transduction du signal induite par l'ET-1 via le récepteur ET_B et que ceci pourrait compenser l'internalisation et la dégradation rapide de ce récepteur (YAMAGUCHI *et al.*, 2003). Toutefois, il a été démontré que le récepteur ET_A pouvait co-localiser avec la CAV-1 sans agoniste dans les cellules CHO (OKAMOTO *et al.*, 2000).

Par contre, BOIVIN *et al.* (2005) ont démontré que les récepteurs à l'ET-1 n'interagissent pas avec la cavéoline-3 (CAV-3) au niveau des myocytes ventriculaires de rat adultes suggérant que le processus d'internalisation serait effectué par un mécanisme n'impliquant pas les caveolae (BOIVIN *et al.*, 2005).

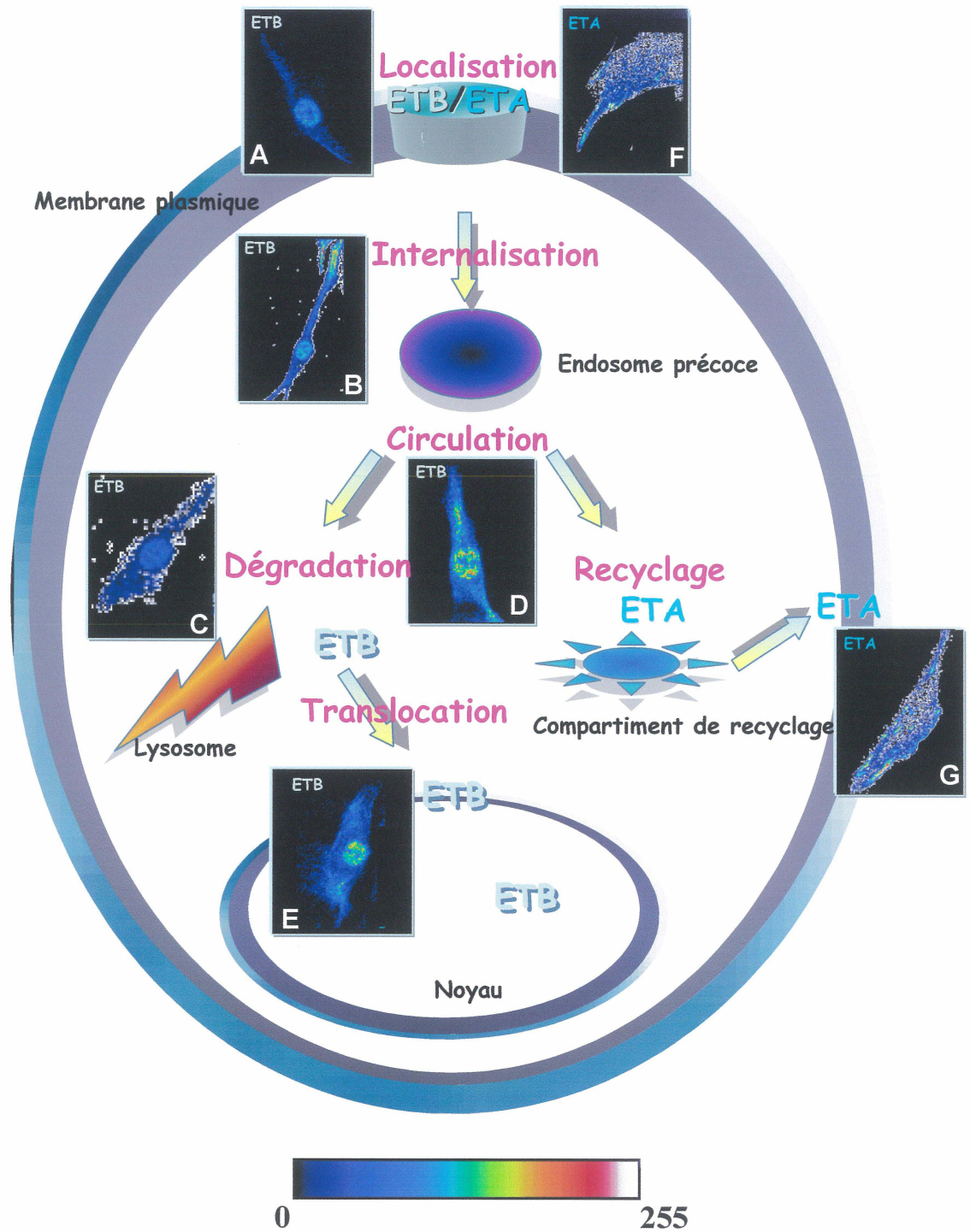
Le groupe de BKAILY (2006) a par la suite mis en évidence l'internalisation des récepteurs ET_A et ET_B au niveau des CMLVs provenant d'aortes humaines (Figure 8). Ils ont montré que les récepteurs ET_A et ET_B sont internalisés en réponse à l'ET-1 mais que les récepteurs ET_A, surtout localisés au niveau de la membrane plasmique de ces cellules, se retrouvent suite à cette stimulation, au niveau périnucléaire pour être ensuite recyclés à la membrane plasmique. Les récepteurs ET_B, quant à eux, s'internalisent et transloquent au noyau avec l'ET-1. Cette étude a révélé que l'ET-1 pouvait induire non seulement l'internalisation du récepteur ET_B mais pouvait aussi augmenter sa densité qui pouvait être bloquée par un traitement à la cycloheximide (inhibiteur de synthèse protéique), suggérant qu'il y avait synthèse de novo de ces récepteurs (BKAILY *et al.*, 2006). ABE *et al.* (2000) a aussi démontré que l'ET-1 pouvait augmenter le nombre des récepteurs ET_A et ET_B même en présence de cycloheximide suggérant un rôle stabilisateur de l'ET-1 pour ses récepteurs (ABE *et al.*, 2000).

En résumé, il semble que le recyclage des récepteurs ET_A (BREMNES *et al.*, 2000; BKAILY *et al.*, 2006) et/ou la stabilisation de ce type de récepteur par sa liaison avec l'ET-1 (ABE *et al.*, 2000) ainsi que l'interaction entre le récepteur ET_A et la cavéoline-1 (CHUN *et al.*, 1994) pourraient expliquer la réponse contractile prolongée rapportée pour ce type de récepteur. Par contre, le ciblage des récepteurs ET_B vers les lysosomes pour leur dégradation pourrait expliquer en grande partie le rôle des ces récepteurs dans la clairance de l'ET-1 circulant (BREMNES *et al.*, 2000; SCHNEIDER *et al.*, 2007).

Figure 8 Représentation schématique de l'internalisation des récepteurs ET_A et ET_B dans les CMLVs humaines

(A et F) En absence d'ET-1 extracellulaire, les récepteurs ET_A et ET_B sont présents au niveau de la membrane plasmique et du cytosol. On retrouve également ET_B est au niveau des membranes de l'enveloppe nucléaire et dans le nucléoplasme. (B-D) La stimulation des récepteurs ET_A et ET_B avec l'ET-1 induit leur internalisation suivie (G) d'un recyclage à la membrane plasmique pour le récepteur ET_A et (C) d'une dégradation ou (E) d'une translocation nucléaire pour le récepteur ET_B. L'échelle de pseudocouleur allant de 0 à 255 représente l'intensité de fluorescence de l'anticorps dirigé contre le récepteur ET_A ou ET_B.

Modifiée de CHOUFANI, 2002



1.8 L'ET-1 et l'endothélium endocardique

Comme nous l'avons vu dans les sections précédentes, l'ET-1, un puissant vasoconstricteur de 21 acides aminés, ainsi que ses récepteurs ET_A et ET_B sont présents dans de nombreux tissus dont l'endothélium endocardique (DAVENPORT *et al.*, 1989; SAETRUM OPGAARD *et al.*, 2001). Des études ont montré que des CEEs isolées de ventricule de chèvre expriment l'ARNm de l'ET-1 et sécrètent une quantité suffisante d'ET-1 pour exercer un effet inotrope positif sur des cardiomyocytes isolés de cette même espèce (MEBAZAA *et al.*, 1993a). WANG et MORGAN (1992) ont étudié la réponse contractile des muscles papillaires isolés du ventricule droit du furet adulte en présence et en absence de l'EE. La dénudation des CEEs du muscle papillaire provoque une diminution de la tension maximale et une abréviation de la durée de la contraction qui ont pu être renversées suite à l'ajout d'ET-1 (WANG et MORGAN, 1992).

Récemment, notre laboratoire a démontré la présence de l'ET-1 et de ses récepteurs au niveau des cellules endothéliales endocardiques d'origine fœtale humaine (Figure 9). Par immunofluorescence indirecte combinée à la microscopie confocale en 3D, il a été possible de détecter la présence hétérogène de l'ET-1 au niveau de la membrane plasmique, du cytosol et plus particulièrement du noyau des CEEGs et des CEEDs. De plus, une densité plus élevée est remarquée au niveau des CEEDs par rapport aux CEEGs où l'ET-1 y est retrouvé sous forme d'agrégats. Le récepteur ET_A présente une distribution homogène au niveau de la membrane

Figure 9 Marquage de l'ET-1 et de ses récepteurs ET_A et ET_B dans les CEEGs et CEEDs isolées du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines

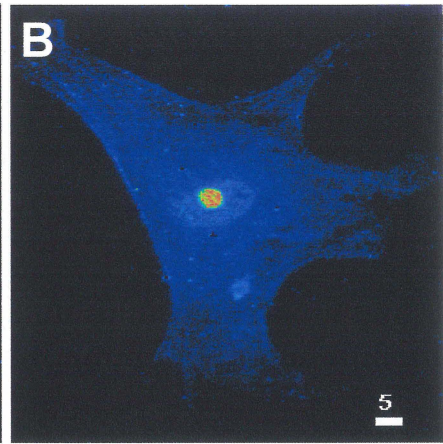
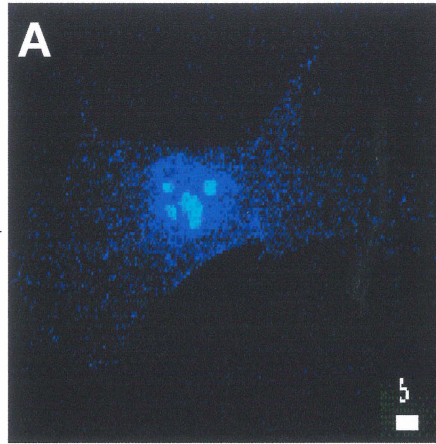
Reconstructions en 3-D (vue de haut) de CEEGs et de CEEDs isolées de cœur fœtal humain montrant l'immunoréactivité de l'ET-1 (A et B), du récepteur ET_A (C et D) et du récepteur ET_B (E et F). L'ET-1 est présent de façon hétérogène au niveau de la membrane plasmique, du cytosol et du noyau (incluant les membranes de l'enveloppe nucléaire), ceci dans les CEEGs et les CEEDs. Sa densité est plus élevée au niveau nucléaire où il est présent en forme d'agrégats. Le récepteur ET_A est distribué de façon homogène et il est présent au niveau de la membrane plasmique, du cytosol et du noyau des CEEGs et CEEDs. Le récepteur ET_B est présent au niveau de la membrane plasmique, du cytosol avec une intensité de fluorescence plus élevée au niveau du noyau et ceci dans les CEEGs et les CEEDs. L'échelle de pseudocouleur représente l'intensité de fluorescence de 0 à 255. L'échelle de mesure en blanc est en μm .

Modifiée de JACQUES et al., 2005

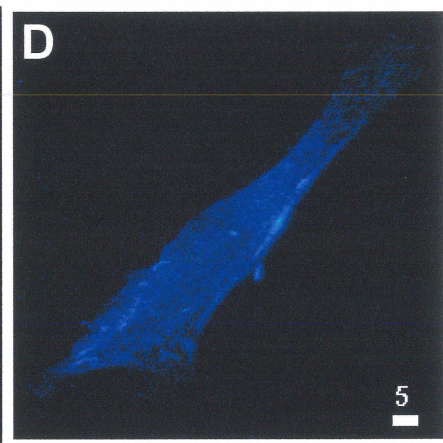
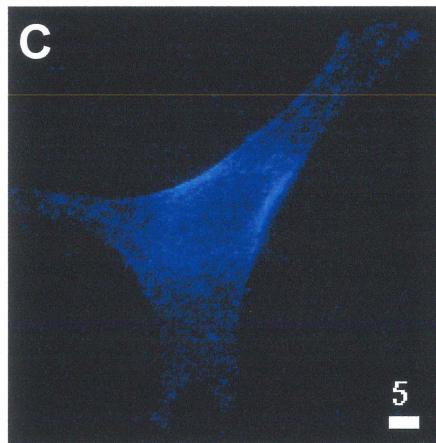
CEEGs

CEEDs

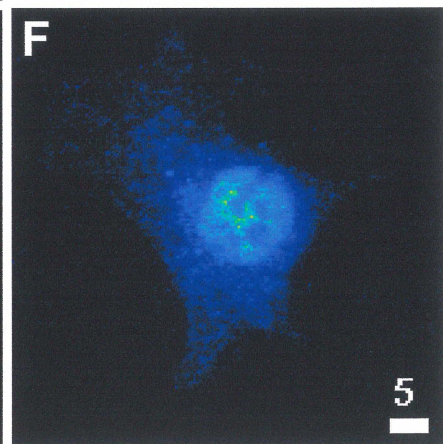
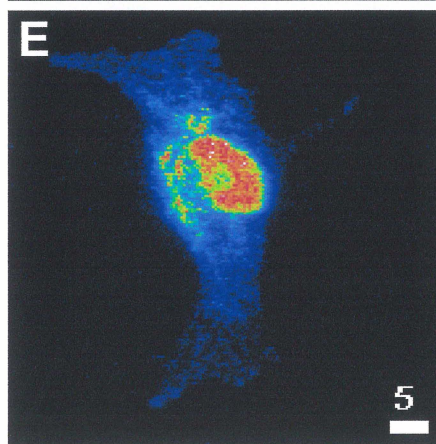
ET-1



ET_A



ET_B



255



0

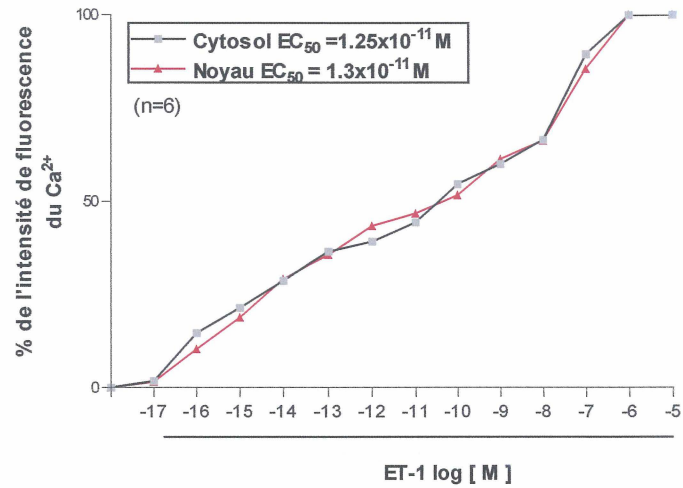
Figure 10 Effet de différentes concentrations d'ET-1 extracellulaire sur les niveaux soutenus du $[Ca^{2+}]_c$ et du $[Ca^{2+}]_n$ des CEEGs et des CEEDs isolées du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines

L'ET-1 à des concentrations entre $10^{-17}M$ et $10^{-5}M$ induit une augmentation concentration-dépendante du $[Ca^{2+}]_c$ et du $[Ca^{2+}]_n$ libre (A) dans les CEEGs et (B) les CEEDs isolées du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines. (A) L'augmentation soutenue des niveaux du $[Ca^{2+}]_n$ et du $[Ca^{2+}]_c$ libre atteint un maximum à une concentration de $10^{-5}M$ d'ET-1. Les valeurs de EC_{50} sont de $3.28 \times 10^{-10}M$ pour le cytosol et de $2.95 \times 10^{-10}M$ pour le noyau. (B) L'augmentation soutenue des niveaux du $[Ca^{2+}]_n$ et du $[Ca^{2+}]_c$ libre atteint un maximum à une concentration de $10^{-6}M$ d'ET-1. Les valeurs de EC_{50} sont de $1.25 \times 10^{-11}M$ pour le cytosol et de $1.3 \times 10^{-11}M$ pour le noyau. « n » est le nombre de cellules de 3 expériences indépendantes pour les CEEGs et de 5 pour les CEEDs.

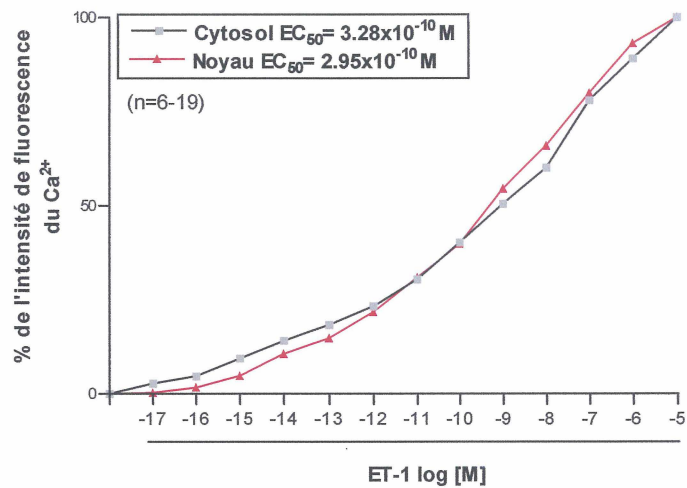
Modifiée de DESCORBETH, 2003

Courbes concentration-réponse de l'effet de l'ET-1 sur le niveau calcique soutenu des CEEGs (A) et des CEEDs (B) isolées du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines.

(A) CEEGs



(B) CEEDs



plasmique, du cytosol et du noyau incluant les membranes de l'enveloppe nucléaire avec une densité similaire au niveau des CEEGs et des CEEDs. En ce qui concerne le récepteur ET_B, il est localisé plus particulièrement au niveau du noyau incluant les membranes de l'enveloppe nucléaire des CEEGs et des CEEDs avec une densité plus élevée chez les CEEGs (JACQUES *et al.*, 2005).

Nous avons également montré que l'ET-1 pouvait induire une augmentation soutenue du $[Ca^{2+}]_c$ et du $[Ca^{2+}]_n$ dans les CEEGs et les CEEDs et avons observé que les CEEGs étaient plus sensibles à l'ET-1 que les CEEDs (JACQUES *et al.*, 2000a, 2005) (Figure 10). De plus, nous avons démontré que l'augmentation du $[Ca^{2+}]_c$ et du $[Ca^{2+}]_n$ par l'ET-1 est relayée par les récepteurs ET_A et ET_B au niveau des CEEGs tandis que cet effet est relayé par le récepteur ET_A au niveau des CEEDs (JACQUES *et al.*, 2005).

1.9 Hypothèse et objectifs de travail

L'endothélium endocardique constitue un système sécréteur et modulateur cardiaque unique qui diffère de façon importante du système endothélial vasculaire (KURUVILLA ET KARTHA, 2003). Comme le système endothélial vasculaire, l'endothélium endocardique sécrète entre autre l'ET-1 et il a été rapporté que ce peptide peut moduler l'homéostasie calcique de ces cellules via l'activation des récepteurs ET_A (JACQUES *et al.*, 2005). Nos récentes études au niveau des CEEs ont montré que les récepteurs ET_A et ET_B sont aussi présents au niveau du noyau des

CEEs (JACQUES *et al.*, 2005). Par contre, leur rôle dans la modulation de l'homéostasie calcique nucléaire n'est pas connu. De plus, le groupe de BKAILY a montré que le récepteur AT₁ de l'Ang II subit lors de son activation une internalisation qui est suivie d'une translocation nucléaire accompagnée d'une synthèse *de novo* (BKAILY *et al.*, 2003b). Basé sur ces évidences, le but de ce mémoire est de tester l'hypothèse suivante: les récepteurs de l'ET-1, et en particulier le récepteur ET_B, présents au niveau des membranes de l'enveloppe nucléaire des CEEs augmentent le Ca²⁺ nucléoplasmique et la sensibilité de ces récepteurs nucléaires est différente de celle connue pour les récepteurs à l'ET-1 de la membrane plasmique. De plus, il est possible que l'activation des récepteurs ET_A et/ou ET_B de la membrane de surface induise leur internalisation, translocation ainsi que leur synthèse *de novo*. De plus, nous proposons que ces phénomènes puissent être différents dans les CEEGs et les CEEDs.

Afin de tester ces hypothèses, nous proposons de répondre aux questions suivantes:

1) Est-ce que l'ET-1 cytosolique augmente le [Ca²⁺]_n lorsque la membrane plasmique des CEEGs et des CEEDs a été perforée ?

Si oui;

- Est-ce que cette augmentation est due à l'activation du récepteur ET_A et/ou du récepteur ET_B présents au niveau des membranes de l'enveloppe nucléaire ?
- Est-ce qu'il existe une différence entre les CEEGs et les CEEDs en terme de sensibilité à l'ET-1 ?

2) Est-ce que l'ET-1 extracellulaire induit la mobilisation des récepteurs ET_A et/ou ET_B présents au niveau de la membrane plasmique ?

Si oui;

- a) Est-ce que les récepteurs ET_A et/ou ET_B subissent une synthèse *de novo* et/ou une dégradation et/ou une translocation au niveau du noyau des CEEGs et des CEEDs ?
- b) Est-ce qu'il existe une différence dans la cinétique de mobilisation du récepteur ET_A et ET_B des CEEGs et des CEEDs ?
- c) Est-ce que la mobilisation et le niveau des récepteurs ET_A et ET_B dépendent de la synthèse protéique *de novo* ?

Afin de répondre à ces questions, nous avons utilisé des CEEs isolées à partir des ventricules gauche et droit de cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines. Les techniques utilisées sont l'immunofluorescence indirecte, la mesure du $[Ca^{2+}]_n$ en utilisant la sonde calcique Fluo-3/AM et en perforant la membrane plasmique à l'aide de l'ionomycine, ainsi que l'imagerie tridimensionnelle générée par la microscopie confocale.

II-MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Isolation et culture des cellules endothéliales endocardiques du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines

Les cellules endothéliales endocardiques sont isolées à partir du ventricule gauche et droit (CEEGs et CEEDs, respectivement) du cœur fœtal humain âgé de 20 semaines en utilisant la trypsine et des méthodes mécaniques (BKAILY *et al.*, 1997b; JACQUES *et al.*, 2000a, 2005). La procédure est en accord avec les recommandations du comité d'éthique de la recherche sur l'humain.

Les cœurs fœtaux humains sont prélevés dans des conditions aseptiques et ils sont immédiatement déposés dans un bœcher contenant une solution stérile de SMEM (Milieu Essentiel Minimal de Suspension) ayant la composition suivante : 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.8 mM MgSO₄, 10 mM NaH₂PO₄ (Gibco BRL, Burlington, ON) et supplémentée de Penicilline-G-Potassium (Ayerst, Montréal, QC). Par la suite, les ventricules sont disséqués et nettoyés de leur sang avec du milieu M199 (Gibco BRL, Burlington, ON) stérile. Afin d'isoler les CEEGs et les CEEDs, les ventricules ouverts sont placés dans une boîte de pétri avec leur face luminale dirigée vers le haut et sont par la suite exposés à 0.05% de trypsine (BioWhittaker, Walkerville, MD) pour 5 minutes à la température de la pièce. L'endothélium endocardique des deux ventricules est ensuite gratté délicatement à l'aide d'une lame de scalpel. Les cellules recueillies sont lavées avec du milieu M199 supplémenté de 10% (v/v) sérum bovin fœtal (FBS) (Gibco BRL, Burlington, ON). Après une centrifugation de 10 minutes à 1000 rpm à 4°C, le surnageant est éliminé et le culot de cellules est resuspendu dans

un milieu M199 supplémenté de 10% (v/v) FBS. Par la suite, les cellules sont déposées dans des pétris ou des contenants de culture.

Pour les études sur des cellules fraîchement isolées, les cellules sont cultivées sur des lamelles de verre de 25 mm de diamètre disposées dans des boîtes de pétri de 35 mm de diamètre et sont incubées à 37°C sous une atmosphère de 5% CO₂. Pour produire des cultures cellulaires primaires, les CEEGs et les CEEDs sont cultivées dans des flacons de culture (Gibco BRL, Burlington, ON) et incubées comme mentionné ci-haut. À confluence, les cellules sont détachées par trypsinisation et recultivées dans du milieu M199 supplémenté de 10% (v/v) de FBS.

Une vérification de la qualité et de la pureté des CEEGs et des CEEDs est effectuée en utilisant une sonde fluorescente spécifique aux résidus α -fucose présents dans le glycocalyx des cellules endothéliales. Cette sonde est la « Lectin Ulex Europeans Agglutinin » conjuguée à la fluorescéine isothiocyanate (FITC) (6 μ g/ml pour 2 heures à la température de la pièce; Sigma-Aldrich, St-Louis, MO) (BKAILY *et al.*, 1997b; JACQUES *et al.*, 2000a, 2005). De plus, les CEEs contiennent le facteur de von Willebrand (vWF) qui peut être détecté par immunofluorescence indirecte (section 2.4.4) en employant un anticorps primaire dirigé contre le vWF (1 :200; Sigma-Aldrich, St-Louis, MO) ainsi qu'un anticorps secondaire anti-IgG de lapin conjugué à l'Alexa Fluor 488 (1 μ g/ml; Molecular Probes, Eugene, OR). Les CEEGs et CEEDs possèdent un réseau développé de réticulum endoplasmique et un grand nombre de mitochondries entourant un noyau volumineux (BKAILY *et al.*, 1999; JACQUES *et al.*, 2003b, 2006a). Elles possèdent également un canal calcique

de type R fonctionnel insensible à la nifédipine mais sensible à l'isradipine (JACQUES *et al.*, 2000a).

2.2 Microscopie confocale

La microscopie confocale offre plusieurs avantages significatifs sur la microscopie à fluorescence conventionnelle : elle permet la génération d'images optiques sériées par élimination de la lumière hors foyer (BKAILY *et al.*, 1997b; NIGGLI et LEDERER, 1990) et offre une résolution d'environ 30% supérieure au microscope conventionnel. Elle permet entre autre un sectionnement non-invasif d'échantillons biologiques ainsi que leur reconstruction en trois dimensions sous n'importe quel angle ou plan de coupe (NIGGLI *et al.*, 1994). Le microscope confocal utilisé au cours de cette étude est un Multi Probe 2001 (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA) muni d'un laser à argon équipé d'un microscope à épifluorescence à phase inverse (Diaphot Nikon) et d'un objectif achromat (Nikon Oil Plan) de 60X.

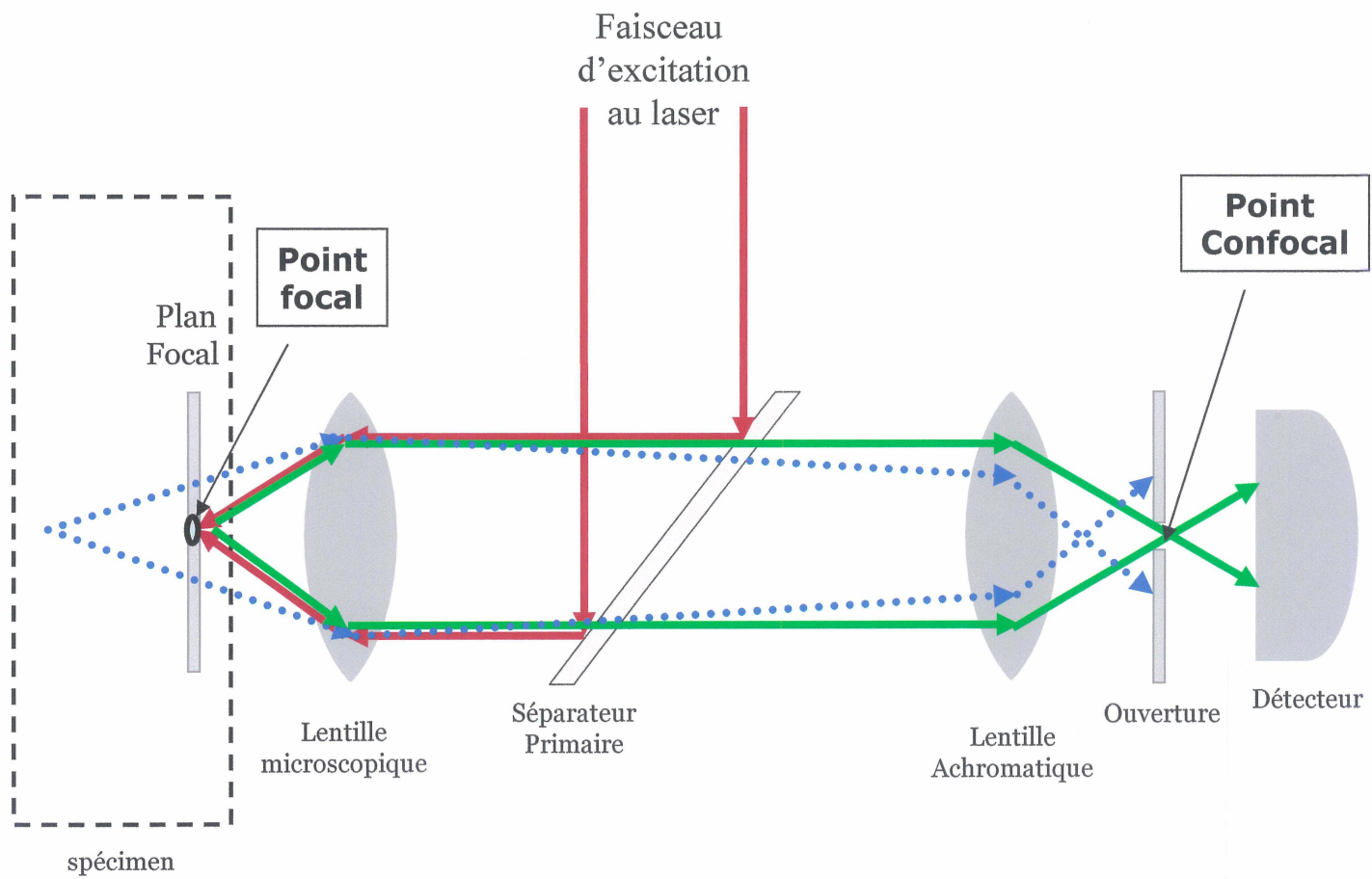
2.2.1 Principe de base

Au niveau du microscope confocal, la lentille du microscope dirige le faisceau de lumière laser vers un point donné de l'échantillon, appelé le point focal (Figure 11). La lumière émise (ou réfléchi) par ce point reprend le même chemin à travers le microscope. Les compartiments optiques du microscope focalisent la lumière de ce

Figure 11 Le point focal et le point confocal dans le système de la microscopie confocale

Dans le système de la microscopie confocale, la lumière d'excitation venant du laser passe par un séparateur primaire et est convergée par les lentilles du microscope au point focal de l'échantillon. Une faible quantité de lumière du laser converge sur d'autres points du plan focal. La fluorescence provenant de l'échantillon repasse par le séparateur primaire afin de séparer la fluorescence émise de celle qui est reflétée. La fluorescence émise est convergée par la lentille achromatique au point confocal et est enregistrée par le détecteur. Tout rayon frappant l'ouverture à des points autres que le point confocal n'est pas détecté.

Modifiée du manuel d'utilisation du microscope Multi Probe 2001



point vers un deuxième point, appelé le point confocal. Un système de volets ou ouvertures, positionné au point confocal, ne laisse passer que la lumière provenant du point focal pour qu'elle se rende au détecteur. Toute lumière incidente provenant de points au-dessus ou en dessous du plan focal, et par conséquent hors foyer, est rejetée par l'ouverture confocale (Manuel d'utilisation du microscope Multi Probe 2001).

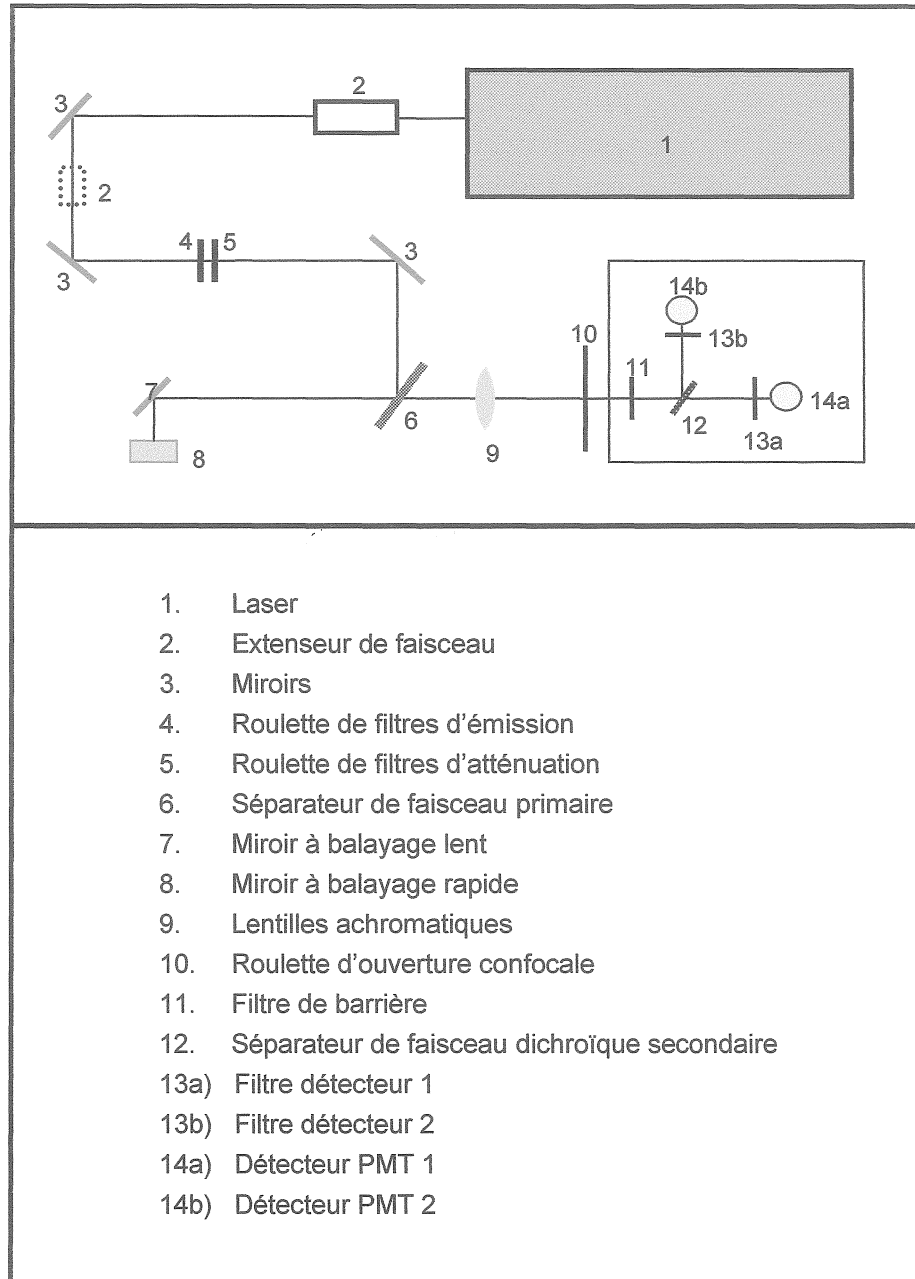
2.2.2 Balayage des cellules

Le faisceau du laser d'argon (9.0 mV), à la longueur d'onde d'excitation de 488 nm, est dirigé sur l'échantillon via un filtre dichroïque primaire de 510 nm et est atténué avec un filtre de densité neutre de 1-3% afin de réduire la défluorescence. L'ouverture confocale est de 100 μm .

Pour toutes les expériences, la résolution des images est de 512 x 512 pixels avec une taille de pixel égale à 0.34 μm . L'intensité du laser, l'acquisition photométrique, la configuration du PMT (multiplicateur de photons) et les filtres sont maintenus constants durant les procédures expérimentales (Figure 12). Les cellules sont balayées le long de l'axe Z par sections sériées pour permettre la reconstruction tridimensionnelle et la prise de mesures du niveau basal de l'intensité de fluorescence ainsi que de la réponse cellulaire suite à l'ajout de différents agents, dans le cytosol aussi bien que dans le noyau (BKAILY *et al.*, 1997b).

Figure 12 Les compartiments optiques du système de la microscopie confocale

Modifiée du manuel d'utilisation du microscope Mutli Probe 2001



2.3 Étude du noyau

2.3.1 Chargement des cellules avec la sonde calcique Fluo-3/AM

Le Fluo-3 est une sonde capable de lier le Ca^{2+} libre et qui, combinée à la microscopie confocale, convient très bien à l'étude de la dynamique spatiale de plusieurs processus élémentaires impliquant la signalisation du Ca^{2+} (BKAILY *et al.*, 1997b).

Les cellules à étudier sont mises en culture sur des lamelles de verre de 25 mm de diamètre qui conviennent à leur montage dans une chambre de 1 ml. Les cellules sont lavées trois fois avec 2 ml d'une solution de Tyrode (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO) ayant comme composition : 136 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 1.9 mM CaCl_2 , 5 mM HEPES, 5.6 mM glucose ajustée à pH 7.4 contenant 0.1% d'albumine de sérum bovin (BSA) (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO). L'osmolarité de la solution de Tyrode avec ou sans BSA est ajustée à 310 mOsm avec du sucrose à l'aide d'un osmomètre (Advanced Instruments Inc., MA).

La sonde calcique Fluo-3/AM (Molecular Probes, Eugene, OR) est diluée dans une solution de Tyrode contenant du BSA à partir d'une solution stock congelée de 1 mM; la concentration finale de la sonde utilisée est de 13 μM (BKAILY *et al.*, 1997b).

Les cellules sont incubées suivant la méthode de la lamelle renversée, en présence de 100 µl de sonde diluée placée sur une plaque de verre enveloppée de parafilm, et ce, pendant 60 minutes. L'incubation se fait dans un environnement humide à l'abri de la lumière afin de minimiser l'évaporation de la sonde calcique (BKAILY *et al.*, 1997b).

Après la période d'incubation, les lamelles sont récupérées et les cellules sont lavées deux fois dans la solution de Tyrode seule. Les cellules chargées sont ensuite laissées dans la solution de Tyrode pour 15 minutes afin de s'assurer de l'hydrolyse totale des groupements acétoxyméthyls esters et ainsi éliminer la forme estérifiée de la sonde calcique (forme AM de la sonde Fluo-3 AM) qui est incapable de lier le Ca^{2+} libre (BKAILY *et al.*, 1997b).

2.3.2 Études de la fluorescence calcique du noyau

Les cellules chargées avec le Fluo-3 sont montées dans un support métallique et plongées dans une solution imitant le milieu intracellulaire ayant la composition suivante : 20 mM NaCl, 140 mM KCl, 2 mM MgCl_2 , 5 mM HEPES, 5 mM D-glucose ajustée à pH 7.2 avec du Trizma Base. Par la suite, la membrane plasmique des cellules est perforée en ajoutant l'ionophore ionomycine (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO) à une concentration de 10^{-8}M pour un maximum de 30 à 60 secondes en présence de 100 nM de CaCl_2 (BKAILY *et al.*, 1997b). Il est à noter que l'addition de 100 nM CaCl_2 à la solution intracellulaire permet de maintenir une homéostasie

calcique entre le noyau et le milieu environnant lors de la perforation de la membrane. De plus, la présence de 100 nM de calcium est nécessaire pour visualiser la perforation de la membrane plasmique à l'ionomycine. Les cellules sont balayées avant et après l'ajout d'ionomycine pour enregistrer la réponse à l'ionophore. Seulement les cellules qui répondent à l'ionomycine ont été sélectionnées pour nos études ultérieures.

Suite à l'addition de l'ionomycine et aussitôt que l'augmentation du Ca^{2+} cytosolique est observée, les cellules sont immédiatement et rapidement (à l'intérieur de quelques secondes) lavées avec la solution imitant le milieu intracellulaire en absence d'ionomycine et en présence de 100 nM de CaCl_2 puis sont laissées pour une période de stabilisation de 5 minutes (BKAILY *et al.*, 1997b). Par la suite, les cellules sont balayées par sections sériées avant (série contrôle du taux calcique basal) et après l'ajout de concentrations croissantes d'ET-1 (10^{-17}M à 10^{-5}M), afin d'étudier l'effet de l'ET-1 sur les niveaux du calcium nucléoplasmique. L'acquisition des séries optiques est effectuée lorsque l'effet de l'ET-1 sur les niveaux du calcium nucléoplasmique se stabilise après l'ajout de chaque concentration d'ET-1. Chaque série comprend entre 12 à 15 sections (512×512) avec un incrément vertical de 0.7 μm . Le nombre de sections ainsi que la distance entre les sections sont rigoureusement maintenus constants durant la durée de l'expérience afin de localiser les variations du calcium nucléoplasmique.

2.3.3 Marquage du noyau

À la fin de chaque expérience, le noyau est marqué avec le Syto-11 (Molecular Probes, Eugene, OR), un marqueur des acides nucléiques, à une concentration de 100 nM. Les cellules sont balayées par sections sériées immédiatement après le développement du marquage (8-10 min). La position, le nombre de sections ainsi que l'incrément entre ces dernières sont maintenus identiques à ceux utilisés au cours de l'expérience. Une reconstruction en trois dimensions du noyau est réalisée afin de délimiter le calcium nucléaire du calcium cytosolique (BKAILY *et al.*, 1997b).

2.3.4 Mesure du calcium nucléaire

Les images balayées sont transférées à une station d'analyse O₂ de Silicon Graphics équipée d'un logiciel d'analyse et de reconstruction « Imagespace 3.2 » de Molecular Dynamics. La reconstruction des images en 3D est présentée en projection d'intensité maximale générant une série d'images montrant l'intensité maximale des unités voxels (BKAILY *et al.*, 1997b).

Les images des cellules chargées au Fluo-3 sont représentées en pseudocouleur suivant une échelle d'intensité allant de 0 à 255 où le noir indique l'intensité zéro et le blanc l'intensité maximale (255). Les mesures de calcium dans le noyau sont effectuées sur des images individuelles et sur des reconstructions en 3D (sections

sérielles). La région du noyau, marquée au Syto-11, est isolée du reste de la cellule en fixant un seuil inférieur d'intensité afin de délimiter les pixels de cet espace. Une série d'images binaires du volume nucléaire est générée en 3D pour chaque cellule en utilisant les mêmes paramètres pour les positions x, y et z que ceux utilisés pendant les mesures calciques. En appliquant ces images binaires aux cellules chargées avec la sonde calcique, une nouvelle projection en 3D est créée montrant les niveaux d'intensité de fluorescence exclusivement dans le noyau (BKAILY *et al.*, 1996, 1997b).

En isolant le noyau de la région cytosolique environnante, il est donc possible de mesurer les valeurs d'intensité moyenne du volume nucléaire en éliminant toute contribution possible du calcium périnucléaire.

2.4 Étude de la mobilisation des récepteurs à l'ET-1

2.4.1 Marquage des récepteurs ET_A et ET_B

L'étude de la localisation ainsi que de la distribution des récepteurs ET_A et ET_B au niveau des CEEGs et CEEDs est réalisée avec la technique d'immunofluorescence indirecte. Des anticorps polyclonaux de lapin dirigés contre l'extrémité C-terminale du récepteur ET_A (Alomone Labs, Jerusalem, Israël) (dilution 1 :100) et contre l'extrémité de la troisième boucle intracellulaire du récepteur ET_B

(Alomone Labs, Jerusalem, Israël) (dilution 1 :100) sont utilisés. L'anticorps secondaire pour les deux récepteurs est un anti-IgG de lapin conjugué à l'Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Eugene, OR) qui est utilisé à une concentration de 1 µg/ml.

Pour déterminer la spécificité de l'immunoréactivité obtenue, trois types de contrôles négatifs sont réalisés. Un premier contrôle est effectué en omettant l'anticorps primaire. Un deuxième contrôle est fait en remplaçant l'anticorps primaire par une concentration équivalente de sérum de lapin (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO) et finalement, un troisième type de contrôle est réalisé en préabsorbant l'anticorps primaire avec le peptide contrôle (Alomone Labs, Jerusalem, Israël) contre lequel l'antisérum ET_A ou ET_B a été dirigé (JACQUES *et al.*, 2005).

2.4.2 Traitement avec l'ET-1

Ces expériences ont été effectuées afin de vérifier l'effet de l'ET-1 sur l'internalisation des récepteurs ET_A et ET_B. Les CEEGs et les CEEDs mises en culture sur des lamelles sont exposées à l'ET-1 (Bachem Bioscience Inc, King of Prussia, PA) 10⁻¹⁰M pour une période de 1, 2, 5, 7, 10, 15, 20 et 30 minutes à 37°C (ABDEL-MALAK, 2003). L'ET-1 est ensuite lavé deux fois avec du PBS 1X, les cellules sont fixées avec du paraformaldéhyde 4% et une immunofluorescence indirecte est effectuée sur celles-ci. La localisation des récepteurs est visualisée par microscopie confocale (JACQUES *et al.*, 2005).

2.4.3 Traitement avec l'ET-1 en présence de cycloheximide

Les traitements décrits à la section 2.4.2 ont aussi été réalisés en présence de cycloheximide (EMD Biosciences, Inc., La Jolla, CA), un inhibiteur de synthèse protéique, pour vérifier si l'ET-1 induit la synthèse *de novo* des récepteurs ET_A et ET_B. En bref, les CEEGs et CEEDs mises en culture sur des lamelles sont exposées à la cycloheximide (10 µg/ml) pendant 30 min avant le traitement à l'ET-1 (10⁻¹⁰M) pour 1, 2, 5, 7, 10, 15, 20 et 30 min à 37°C (BKAILY *et al.*, 2003b; KAMAL, 2003).

2.4.4 Technique de l'immunofluorescence indirecte

La technique utilisée a été modifiée de BRISMAR *et al.* (1998) et décrite par BKAILY *et al.* (1997b) et JACQUES *et al.* (2005). En bref, les CEEGs et les CEEDs mises en culture sur des lamelles de 25 mm sont fixées pendant 10 min avec une solution de paraformaldéhyde 4% (v/v) (Cedarlane, Homby, ON) et sont ensuite lavées deux fois rapidement avec du PBS 1X, pH 7.4. Les cellules à étudier sont ensuite incubées pendant 10 min dans une solution de borohydrure de sodium (2 mg/ml) (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO) afin de neutraliser les groupements aldéhydes, et sont lavées deux fois pendant 5 min avec du PBS. Afin de perméabiliser les cellules et de bloquer les sites de liaison non-spécifiques, les cellules sont incubées pendant 30 min dans une solution de Triton (0.1%) contenant 7% de sérum normal de chèvre (NGS) (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO) et 5% de lait écrémé en poudre (Sigma-

Aldrich, St-Louis, MO) à la température de la pièce. Par la suite, les cellules sont incubées avec l'anticorps primaire à 4°C pendant toute la nuit dans une solution de Triton (0.1%) contenant 1.4% de NGS et 1% de lait écrémé en poudre. Les préparations sont ensuite lavées deux fois avec du PBS et sont incubées pendant une heure à la température de la pièce et à l'obscurité avec un anticorps secondaire fluorescent dans une solution de Triton (0.1%) contenant 1.4 % de NGS et 1% de lait écrémé en poudre (BRISMAR *et al.*, 1998). Finalement, les cellules sont visualisées par microscopie confocale.

2.4.5 Visualisation et quantification du marquage par microscopie confocale

Pour la visualisation et la quantification de l'intensité de fluorescence par microscopie confocale, les cellules sont mises en culture sur des lamelles de 25 mm de diamètre qui conviennent à la chambre d'expérimentation comportant 1 ml de tampon PBS. Pour toutes les expériences, la résolution des images est de 512 x 512 pixels avec une taille de pixel égale à 0.34 μm . L'intensité du laser, l'acquisition photométrique, la configuration du PMT (multiplicateur de photons) et les filtres sont maintenus constants durant les procédures expérimentales (BKAILY *et al.*, 1997b, 2003a, 2003b). Les échantillons sont balayés le long de l'axe z par sections sériées pour permettre la reconstruction tridimensionnelle et la prise de mesures au niveau de l'intensité de fluorescence.

Les paramètres utilisés pour la visualisation et la mesure de l'intensité de fluorescence de la sonde Alexa Fluor 488 par microscopie confocale sont les mêmes que ceux décrits pour les mesures du Ca^{2+} par la détection du complexe Ca^{2+} /Fluo-3. L'ouverture confocale est toujours de 100 μm . Les mesures de l'intensité de fluorescence sont exprimées soit en valeurs absolues selon l'échelle de pseudocouleur allant de 0 à 255, soit en pourcentage par rapport au contrôle.

2.5 Statistiques

Les niveaux d'intensité du calcium libre nucléaire ainsi que du marquage des récepteurs ET_A et ET_B sont représentés comme des valeurs moyennes d'intensité relative de fluorescence ou comme pourcentage d'augmentation ou de diminution par rapport au contrôle. Tous les résultats sont exprimés en moyennes \pm E.S.M. (Erreur Standard à la Moyenne) et le « n » est le nombre de cellules d'au moins trois expériences (N) différentes. La signification statistique des résultats est déterminée en utilisant le test t non-paramétrique. Les valeurs de probabilité (p) inférieures à 0.05 (intervalle de confiance de 90%) sont considérées comme significatives.

III-RÉSULTATS

3.1 Effet de l'ET-1 cytosolique sur le $[Ca^{2+}]_n$ basal des CEEGs et CEEDs à membrane plasmique perforée

En 1997, Bkaily *et al.* a démontré, en utilisant la méthode de la perforation de la membrane plasmique, que l'application d'une concentration élevée d'ET-1 ($10^{-7}M$) au niveau cytosolique (en absence de Ca^{2+}) induit une augmentation du calcium nucléaire dans les cellules aortiques humaines. De plus, l'ET-1 cytosolique (en présence de 100 nM de Ca^{2+}) induit une augmentation concentration-dépendante du calcium nucléaire dans les cellules cardiaques (BKAILY *et al.*, 2002) ainsi que dans les cellules du muscle lisse vasculaire (BKAILY *et al.*, 2000). Jacques *et al.* (2005) a récemment démontré la présence des récepteurs à l'ET-1 au niveau de la membrane plasmique ainsi qu'au niveau des membranes de l'enveloppe nucléaire des CEEGs et des CEEDs isolées de cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines. Ce groupe a aussi démontré que les récepteurs présents au niveau de la membrane plasmique de ces cellules étaient fonctionnels (JACQUES *et al.*, 2000a).

Dans cette série d'expériences, nous avons voulu vérifier si les récepteurs à l'ET-1 présents au niveau des membranes de l'enveloppe nucléaire de ces cellules sont fonctionnels et si leur sensibilité à l'ET-1 est différente par rapport à ceux présents au niveau de la membrane plasmique. Par conséquent, nous avons testé l'effet de concentrations croissantes d'ET-1 cytosolique ($10^{-17}M$ à $10^{-5}M$) sur le $[Ca^{2+}]_n$ des CEEGs et des CEEDs en utilisant la méthode de perforation de la

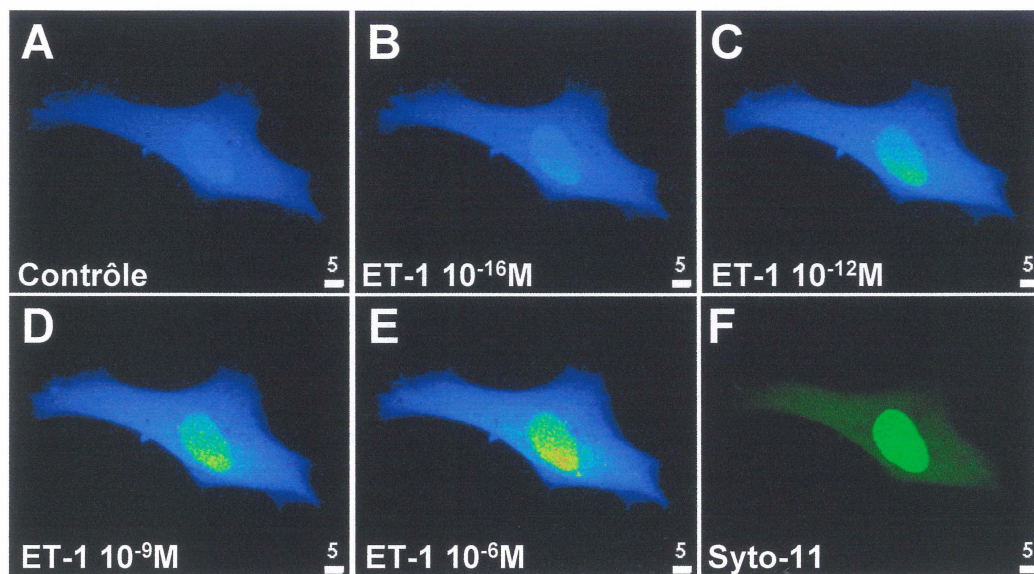
membrane plasmique à l'ionomycine telle que décrit précédemment (section 2.3.2 du Matériel et Méthodes; BKAILY *et al.*, 1997b).

La figure 13 montre un exemple de l'effet concentration-dépendant de l'ET-1 cytosolique sur l'intensité de fluorescence du calcium libre nucléaire dans les CEEGs (panneaux A à E) et CEEDs (panneaux G à K) à membrane plasmique perforée. L'enregistrement a été fait après que chaque concentration d'ET-1 a induit un effet soutenu (10 à 15 min). Nous pouvons constater dans cette figure la distribution calcique nucléaire au niveau contrôle et suite à la stimulation par l'ET-1 cytosolique à des concentrations de 10^{-16} , 10^{-12} , 10^{-9} et 10^{-6} M. Il est à noter que l'intensité de fluorescence du complexe Ca^{2+} /Fluo-3 est indiquée selon une échelle de pseudocouleur, où la couleur noire représente l'intensité zéro de la concentration de Ca^{2+} alors que la couleur blanche représente l'intensité maximale (255). À la fin de chaque expérience, le noyau des cellules est marqué par la sonde des acides nucléiques, le Syto-11 (panneaux F et L) afin de confirmer l'attribution de la réponse calcique au niveau nucléaire. De plus, ce marquage permet par la suite d'analyser le niveau de calcium libre à l'intérieur du noyau. Les mesures d'intensité de fluorescence du complexe Ca^{2+} /Fluo-3 sont obtenues grâce à l'analyse de la distribution tridimensionnelle effectuée à partir d'images optiques sériées générées par la microscopie confocale.

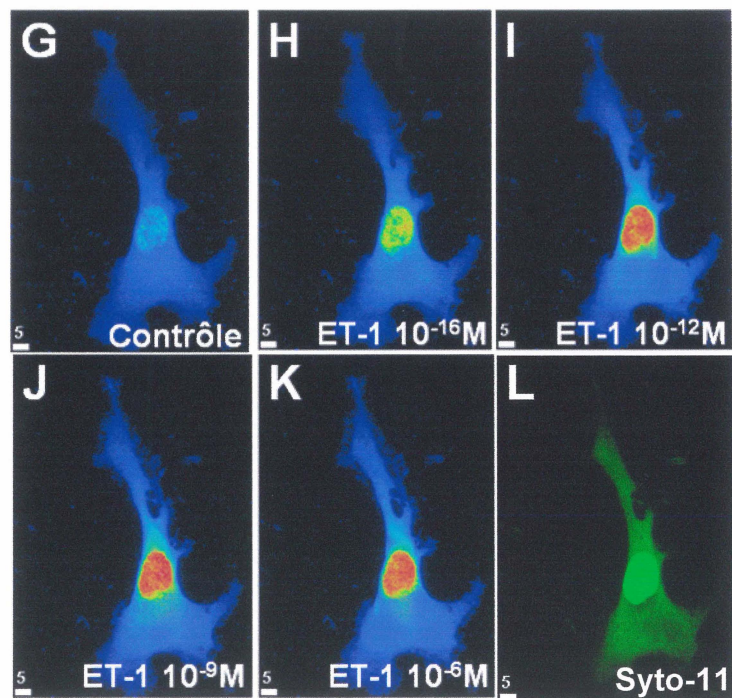
Figure 13 Expérience représentative de l'effet de concentrations croissantes d'ET-1 cytosolique sur le niveau basal de calcium nucléaire ($[Ca^{2+}]_n$) dans les CEEGs et CEEDs à membrane plasmique perforée

Reconstruction en 3-D (vue de haut) d'une CEEG et d'une CEED avant (A et G) et après (B-E et H-K) l'addition subséquente de différentes concentrations d'ET-1 i.e. 10^{-16} , 10^{-12} , 10^{-9} et $10^{-6}M$, respectivement. L'ET-1 cytosolique induit une augmentation concentration-dépendante soutenue du $[Ca^{2+}]_n$ dans les CEEGs et CEEDs. Les panneaux F et L sont la délimitation du noyau de la cellule dans les panneaux A et G respectivement avec le marqueur des acides nucléiques, le Syto-11 (100 nM). La couleur verte des panneaux F et L n'a aucune valeur mesurable. L'échelle de pseudocouleur représente l'intensité de fluorescence du complexe Ca^{2+} /Fluo-3, allant de 0 à 255. L'échelle de mesure en blanc est en μm .

CEEG



CEED

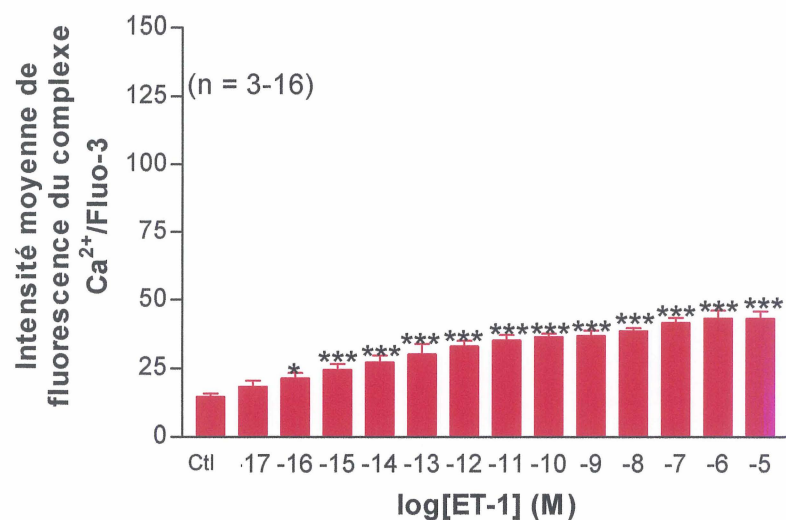


La figure 14 (panneaux A et B) montre la compilation des résultats de l'effet de l'ajout de concentrations croissantes d'ET-1 cytosolique sur le niveau de $[Ca^{2+}]_n$ libre soutenu des noyaux de CEEGs et de CEEDs tandis que les panneaux C et D montrent les courbes concentration-réponse. La figure 14 A montre que le niveau basal de $[Ca^{2+}]_n$ libre soutenu des CEEGs en absence d'ET-1 est de 14.49 ± 1.15 (n=16). L'application d'ET-1 au niveau cytosolique de $10^{-17}M$ à $10^{-5}M$ induit une augmentation progressive du $[Ca^{2+}]_n$. Une concentration de $10^{-17}M$ d'ET-1 n'affecte pas de façon significative le niveau de $[Ca^{2+}]_n$ par rapport au contrôle ($10^{-17}M$: 18.20 ± 2.23 , n=5). Cependant, l'effet de l'ET-1 cytosolique sur le $[Ca^{2+}]_n$ devient significatif à partir d'une concentration de $10^{-16}M$ ($10^{-16}M$: 24.41 ± 2.17 , n=6, $p<0.05$; $10^{-15}M$: 24.41 ± 2.17 , n=6, $p<0.001$; $10^{-14}M$: 27.15 ± 2.48 , n=5, $p<0.001$; $10^{-13}M$: 30.01 ± 3.88 , n=7, $p<0.001$; $10^{-12}M$: 33.08 ± 2.03 , n=4, $p<0.001$; $10^{-11}M$: 35.23 ± 1.90 , n=4, $p<0.001$; $10^{-10}M$: 36.43 ± 1.26 , n=3, $p<0.001$; $10^{-9}M$: 36.75 ± 2.04 , n=3, $p<0.001$; $10^{-8}M$: 38.52 ± 1.22 , n=4, $p<0.001$; $10^{-7}M$: 41.60 ± 1.86 , n=4, $p<0.001$; $10^{-6}M$: 43.20 ± 2.87 , n=5, $p<0.001$; $10^{-5}M$: 43.23 ± 2.55 , n=4, $p<0.001$). La figure 14 B montre que le niveau basal de $[Ca^{2+}]_n$ libre soutenu des CEEDs en absence d'ET-1 est de 28.12 ± 4.07 (n=19). L'application d'ET-1 au niveau cytosolique de $10^{-17}M$ à $10^{-5}M$ induit une augmentation croissante du $[Ca^{2+}]_n$. Des concentrations d'ET-1 de 10^{-17} , 10^{-16} et $10^{-15}M$ n'affectent pas de façon significative le niveau de $[Ca^{2+}]_n$ par rapport au contrôle ($10^{-17}M$: 31.42 ± 4.38 , n=9; $10^{-16}M$: 38.52 ± 5.51 , n=9; $10^{-15}M$: 42.54 ± 7.02 , n=9). L'effet de l'ET-1 cytosolique sur le $[Ca^{2+}]_n$ devient très significatif à partir d'une concentration de $10^{-14}M$ ($10^{-14}M$: 46.41 ± 8.18 , n=8, $p<0.01$; $10^{-13}M$: 56.19 ± 5.95 , n=4, $p<0.01$) et hautement significatif à

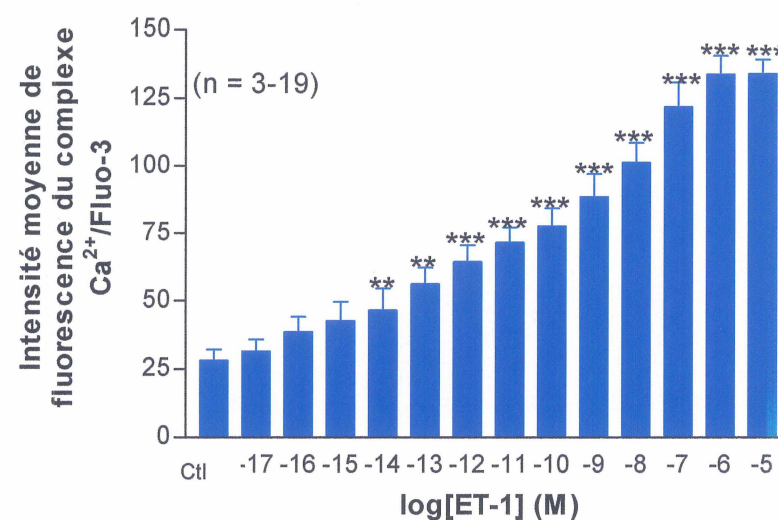
Figure 14 Effet de concentrations croissantes d'ET-1 cytosolique sur le niveau basal de $[Ca^{2+}]_n$ des CEEGs et des CEEDs à membrane plasmique perforée

(A) Histogramme montrant l'augmentation concentration-dépendante du niveau de $[Ca^{2+}]_n$ suite à une stimulation à l'ET-1 ($10^{-17}M$ à $10^{-5}M$) dans les CEEGs. Une augmentation significative du niveau de $[Ca^{2+}]_n$ par rapport au niveau basal est observée à partir de la concentration de $10^{-16}M$. (B) Histogramme montrant l'augmentation concentration-dépendante du niveau de $[Ca^{2+}]_n$ suite à une stimulation à l'ET-1 ($10^{-17}M$ à $10^{-5}M$) dans les CEEDs. Une augmentation significative du niveau de $[Ca^{2+}]_n$ par rapport au niveau basal est observée à partir de la concentration de $10^{-14}M$. (C) Courbe concentration-réponse montrant l'effet de l'ET-1 cytosolique sur le $[Ca^{2+}]_n$ des CEEGs. La valeur de EC_{50} obtenue est de $1.243 \times 10^{-14}M$. (D) Courbe concentration-réponse montrant l'effet de l'ET-1 cytosolique sur le $[Ca^{2+}]_n$ des CEEDs. La valeur de EC_{50} obtenue est de $5.039 \times 10^{-11}M$. Les valeurs sont présentées comme moyennes \pm erreur standard de la moyenne. ★ : comparaison au contrôle; ★ $p < 0.05$, ★★ $p < 0.01$, ★★★ $p < 0.001$. « n » est le nombre de cellules d'au moins 3 expériences indépendantes.

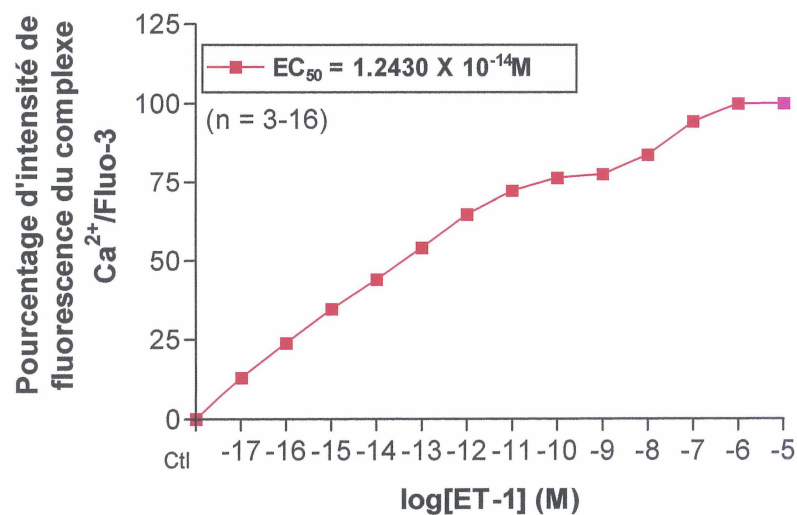
(A) Effet de l'ET-1 cytosolique sur le Ca^{2+} nucléaire des CEEGs



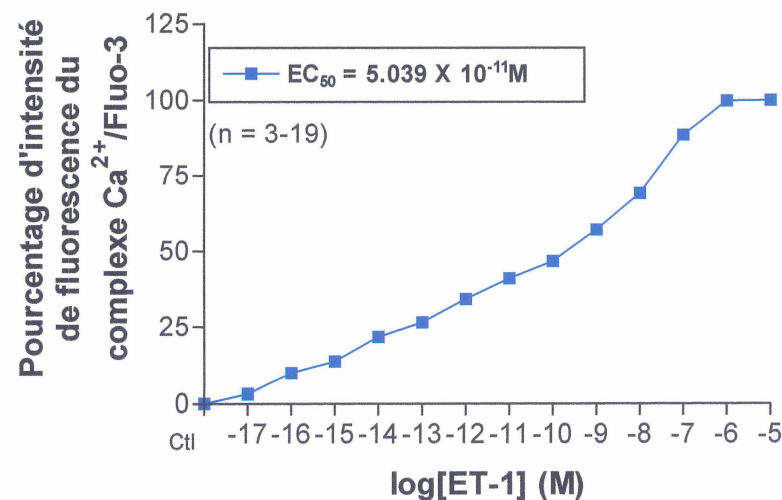
(B) Effet de l'ET-1 cytosolique sur le Ca^{2+} nucléaire des CEEDs



(C) Effet concentration-dépendant de l'ET-1 cytosolique sur le Ca^{2+} nucléaire des CEEGs



(D) Effet concentration-dépendant de l'ET-1 cytosolique sur le Ca^{2+} nucléaire des CEEDs



partir de 10^{-12} M (10^{-12} M : 64.27 ± 6.24 , n=7, $p<0.001$; 10^{-11} M : 71.52 ± 5.62 , n=11, $p<0.001$; 10^{-10} M : 77.66 ± 6.81 , n=11, $p<0.001$; 10^{-9} M : 88.60 ± 8.54 , n=9, $p<0.001$; 10^{-8} M : 101.49 ± 7.45 , n=5, $p<0.001$; 10^{-7} M : 122.02 ± 9.05 , n=3, $p<0.001$; 10^{-6} M : 134.06 ± 6.92 , n=3, $p<0.001$; 10^{-5} M : 134.27 ± 5.32 , n=3, $p<0.001$).

La figure 14 (panneaux C et D) montre les courbes concentration-réponse de l'effet de l'ET-1 cytosolique sur le $[Ca^{2+}]_n$ des CEEGs et des CEEDs respectivement. Comme nous pouvons le constater, le EC_{50} de l'effet de l'ET-1 sur le $[Ca^{2+}]_n$ des noyaux des CEEDs (5.039×10^{-11} M) est plus élevé par rapport à celui des noyaux des CEEGs (1.243×10^{-14} M).

Nos résultats suggèrent que l'activation des récepteurs à l'ET-1 au niveau du noyau par l'ET-1 cytosolique induit une augmentation concentration-dépendante du $[Ca^{2+}]_n$ dans les CEEGs et les CEEDs à membrane plasmique perforée et que les CEEGs sont plus sensibles à l'ET-1 que les CEEDs.

3.2 Effet de l'administration cytosolique des antagonistes des récepteurs ET_A et ET_B sur l'augmentation du $[Ca^{2+}]_n$ induite par l'ET-1 cytosolique dans les CEEGs et CEEDs

Dans cette série d'expériences, nous avons voulu déterminer si l'effet de l'ET-1 cytosolique sur le $[Ca^{2+}]_n$ est relayé via les récepteurs ET_A et/ou ET_B . Pour ce faire,

nous avons testé l'effet des antagonistes des récepteurs ET_A et ET_B (ABT-627 et A-192621, respectivement) en mode préventif i.e. avant l'ajout d'ET-1.

3.2.1 Effet préventif de l'antagoniste du récepteur ET_A, le ABT-627, sur l'augmentation du [Ca²⁺]_n induite par l'ET-1 cytosolique dans les CEEs à membrane plasmique perforée

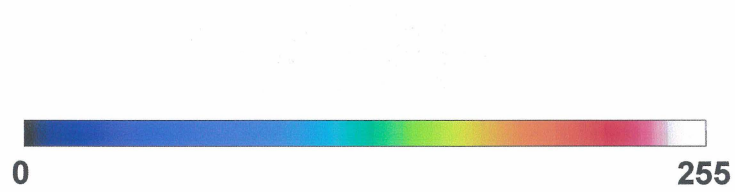
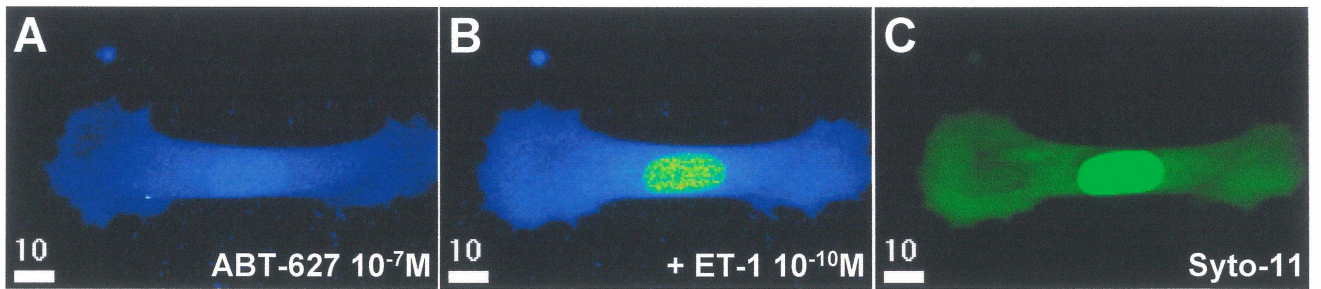
Afin d'étudier le rôle du récepteur ET_A dans la réponse calcique nucléaire induite par l'ET-1 cytosolique dans les CEEGs et CEEDs à membrane plasmique perforée, nous avons utilisé le bloqueur ABT-627 connu pour être un antagoniste non-peptidique du récepteur ET_A (WU-WONG *et al.*, 2002). La concentration d'ET-1 choisie pour effectuer ces expériences est de 10⁻¹⁰M, une concentration physiologique qui est équivalente à l'EC₅₀ des CEEDs intactes et qui est très près de l'EC₅₀ des CEEGs intactes. Il est à noter que cette concentration est capable d'induire une augmentation statistiquement significative mais non saturante du calcium intracellulaire.

La figure 15 montre un exemple du niveau de [Ca²⁺]_n des CEEGs (panneaux A et B) et des CEEDs (D et E) à membrane plasmique perforée. À la fin de l'expérience, le noyau des cellules est marqué par la sonde des acides nucléiques, le Syto-11 (panneaux C et F) afin de confirmer l'attribution de la réponse calcique au niveau nucléaire. Les CEEGs et les CEEDs sont incubées pendant 15 minutes en présence de 10⁻⁷M de ABT-627, une concentration connue pour bloquer

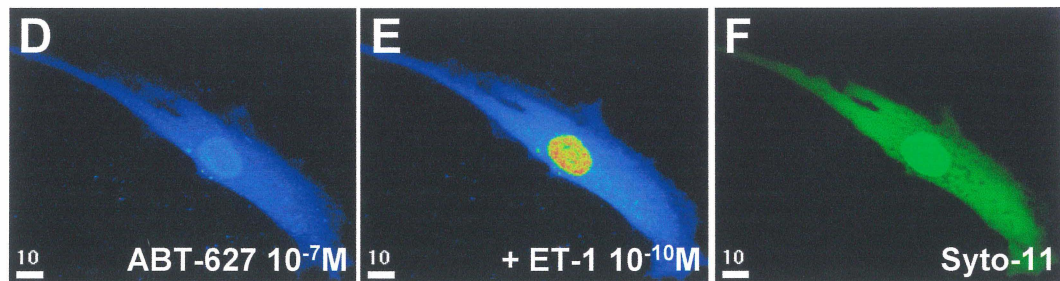
Figure 15 Expérience représentative de l'effet préventif de l'antagoniste du récepteur ET_A , le ABT-627, sur l'augmentation du $[Ca^{2+}]_n$ induite par l'ET-1 cytosolique dans les CEEs à membrane plasmique perforée

Les panneaux (A) et (D) représentent les niveaux de $[Ca^{2+}]_n$ d'une CEEG et d'une CEED isolées des cœurs foetaux humains âgés de 20 semaines en présence de l'antagoniste, le ABT-627 ($10^{-7}M$). En présence du ABT-627 ($10^{-7}M$), l'ajout d'ET-1 ($10^{-10}M$) augmente le $[Ca^{2+}]_n$ au niveau des CEEGs et des CEEDs. (C et F) Délimitation du noyau à l'aide du marqueur des acides nucléiques, le Syto-11. L'échelle de pseudocouleur représente l'intensité de fluorescence de la sonde Ca^{2+} /Fluo-3, allant de 0 à 255. L'échelle de mesure en blanc est en μm . A et D sont deux cellules différentes de 2 expériences différentes.

CEEG



CEED



complètement le récepteur ET_A (WU-WONG *et al.*, 2002). Comme l'illustre la figure 15, le ABT-627 ne prévient pas l'augmentation soutenue du $[Ca^{2+}]_n$ induite par l'ET-1 cytosolique ($10^{-10}M$) au niveau des CEEGs et des CEEDs (panneaux B et E). Les panneaux A et B de la figure 16 montrent la moyenne des mesures des niveaux de $[Ca^{2+}]_n$ des CEEGs (n=5) et des CEEDs (n=6). Pour les CEEGs, et comme l'indique la figure 16 A, en présence de ABT-627 ($10^{-7}M$), le niveau de $[Ca^{2+}]_n$ est de 24.12 ± 3.54 (n=5). L'addition subséquente d'ET-1 ($10^{-10}M$) induit une augmentation significative du niveau du $[Ca^{2+}]_n$ (35.92 ± 1.82 ; $p < 0.01$; n=5). Pour les CEEDs, comme on peut le remarquer dans la figure 16 B, en présence de ABT-627 ($10^{-7}M$), le niveau de $[Ca^{2+}]_n$ est de 23.54 ± 4.14 (n=6). L'ajout subséquent d'ET-1 ($10^{-10}M$) induit une augmentation significative du $[Ca^{2+}]_n$ (41.68 ± 6.15 ; $p < 0.01$; n=6). Ces résultats suggèrent que le récepteur ET_A n'est pas impliqué dans la réponse calcique nucléaire soutenue induite par l'ET-1 cytosolique au niveau des CEEGs et des CEEDs.

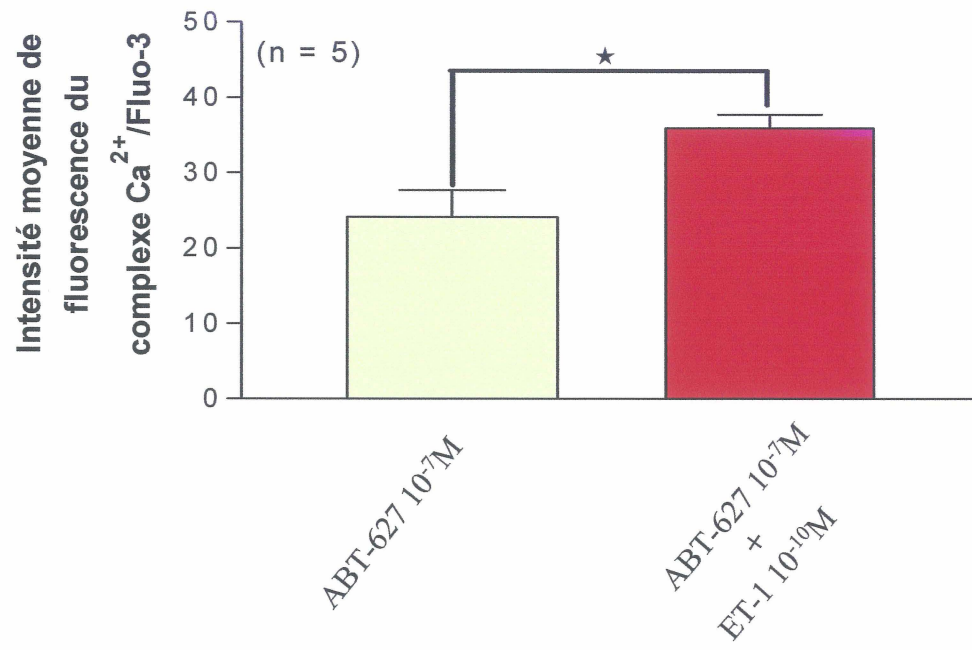
3.2.2 Effet préventif de l'antagoniste du récepteur ET_B, le A-192621, sur l'augmentation du $[Ca^{2+}]_n$ induite par l'ET-1 cytosolique dans les CEEs à membrane plasmique perforée

Afin d'étudier le rôle du récepteur ET_B dans la réponse calcique nucléaire induite par l'ET-1 cytosolique dans les CEEGs et CEEDs à membrane plasmique perforée, nous avons utilisé le bloqueur A-192621 connu pour être un antagoniste non-peptidique du récepteur ET_B (WU-WONG *et al.*, 2002). La concentration d'ET-1

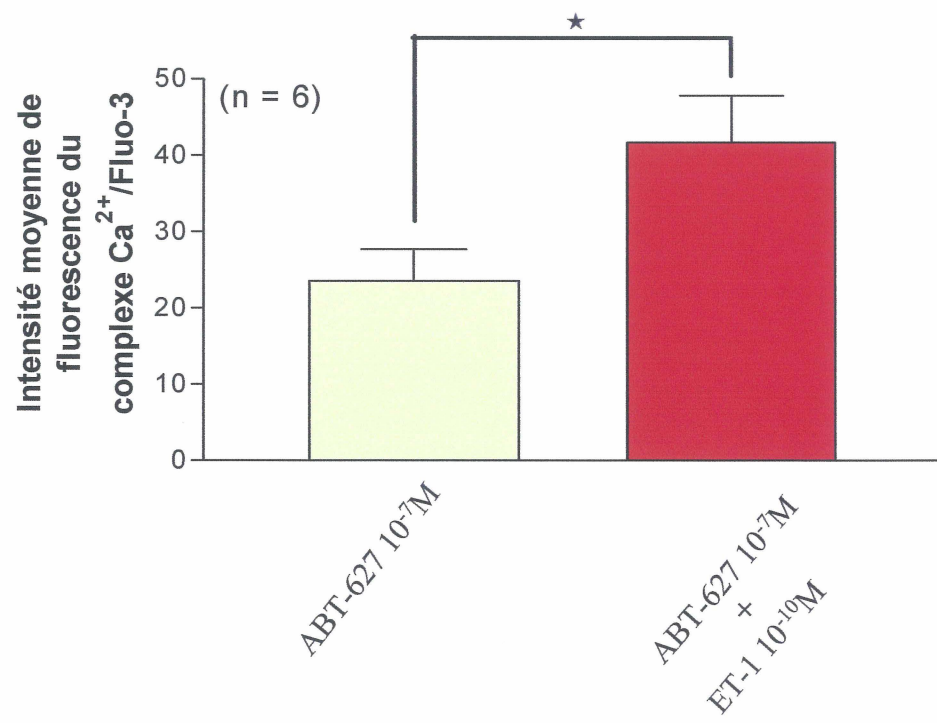
Figure 16 Effet préventif de l'antagoniste du récepteur ET_A, le ABT-627, sur l'augmentation du $[Ca^{2+}]_n$ induite par l'ET-1 cytosolique dans les CEEs à membrane plasmique perforée

Ces histogrammes représentent la mesure de l'intensité de fluorescence du $[Ca^{2+}]$ nucléaire dans les CEEGs (A) et les CEEDs (B) isolées de cœurs foetaux humains âgés de 20 semaines dont la membrane plasmique a été perforée à l'ionomycine. En présence de l'antagoniste du récepteur ET_A, le ABT-627 ($10^{-7}M$), l'ajout d'ET-1 ($10^{-10}M$) induit une augmentation significative du $[Ca^{2+}]_n$ au niveau des CEEGs et des CEEDs. Les valeurs sont représentées comme moyenne \pm erreur standard de la moyenne. Pour les mesures du calcium en 3D, les valeurs de l'intensité de fluorescence calcique nucléaire sont obtenues à partir de cellules reconstruites en 3D, suite à l'enregistrement d'images optiques sériées. «n» est le nombre de cellules de 5 expériences indépendantes pour les CEEGs et de 6 pour les CEEDs. ★ $p < 0.05$.

(A) CEEGs



(B) CEEDs



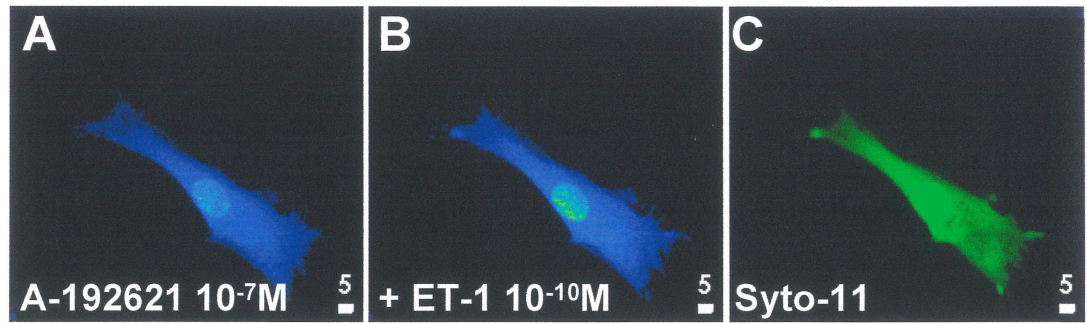
choisie pour effectuer ces expériences est de 10^{-10} M, une concentration physiologique qui est équivalente à l' EC_{50} des CEEDs intactes et qui est très près de l' EC_{50} des CEEGs intactes. Il est à noter que cette concentration est capable d'induire une augmentation statistiquement significative mais non saturante du calcium intracellulaire.

La figure 17 montre un exemple typique du niveau de $[Ca^{2+}]_n$ des CEEGs (panneaux A et B) et des CEEDs (D et E) à membrane plasmique perforée. À la fin de chaque expérience, le noyau des cellules est marqué par la sonde des acides nucléiques, le Syto-11 (panneaux C et F) afin de confirmer l'attribution de la réponse calcique au niveau nucléaire. Les CEEGs et les CEEDs sont incubées pendant 15 minutes en présence de 10^{-7} M de A-192621, une concentration connue pour bloquer complètement le récepteur ET_B (WU-WONG *et al.*, 2002). Comme le montre la figure 17, le A-192621 prévient l'augmentation soutenue du $[Ca^{2+}]_n$ induite par l'ET-1 cytosolique (10^{-10} M) au niveau des CEEGs et des CEEDs (panneaux B et E). Les panneaux A et B de la figure 18 montrent la moyenne des mesures des niveaux de $[Ca^{2+}]_n$ des CEEGs (n=9) et des CEEDs (n=7). Pour les CEEGs, et comme l'indique la figure 18 A, en présence de A-192621 10^{-7} M, le niveau de $[Ca^{2+}]_n$ est de 18.09 ± 3.30 (n=9). L'ajout subséquent d'ET-1 (10^{-10} M) n'affecte pas le niveau de $[Ca^{2+}]_n$ (24.60 ± 5.23 ; n=9). Pour les CEEDs et comme on peut le remarquer dans la figure 18 B, en présence de A-192621 (10^{-7} M) le niveau de $[Ca^{2+}]_n$ est de 21.92 ± 2.70 ;

Figure 17 Expérience représentative de l'effet préventif de l'antagoniste du récepteur ET_B , le A-192621, sur l'augmentation du $[Ca^{2+}]_n$ induite par l'ET-1 cytosolique dans les CEEs à membrane plasmique perforée

Les panneaux (A) et (D) représentent les niveaux de $[Ca^{2+}]_n$ d'une CEEG et d'une CEED isolées des cœurs fœtaux humains âgés de 20 semaines en présence de A-192621 ($10^{-7}M$). En présence de A-192621 ($10^{-7}M$), l'ajout d'ET-1 ($10^{-10}M$) n'affecte pas le niveau de $[Ca^{2+}]_n$ des CEEGs et des CEEDs (B et E). (C et F) Délimitation du noyau à l'aide du marqueur des acides nucléiques, le Syto-11. L'échelle de pseudocouleur représente l'intensité de fluorescence de la sonde Ca^{2+} /Fluo-3, allant de 0 à 255. L'échelle de mesure en blanc est en μm . A et D sont deux cellules différentes de 2 expériences différentes.

CEEG



CEED

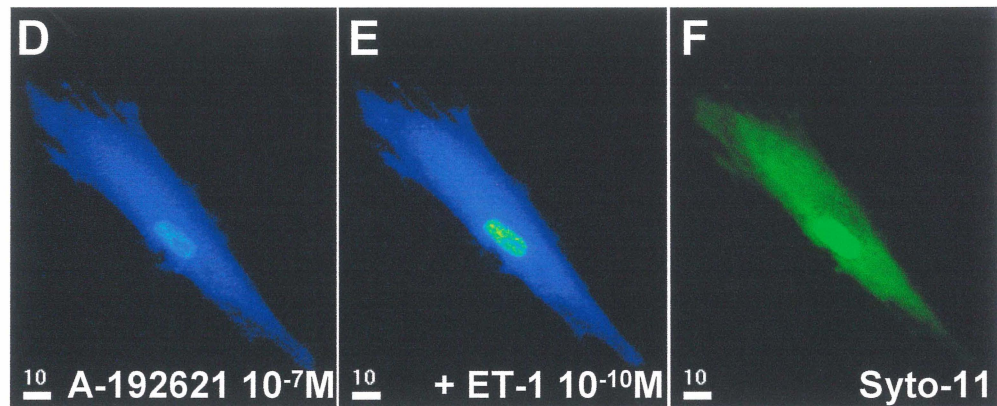
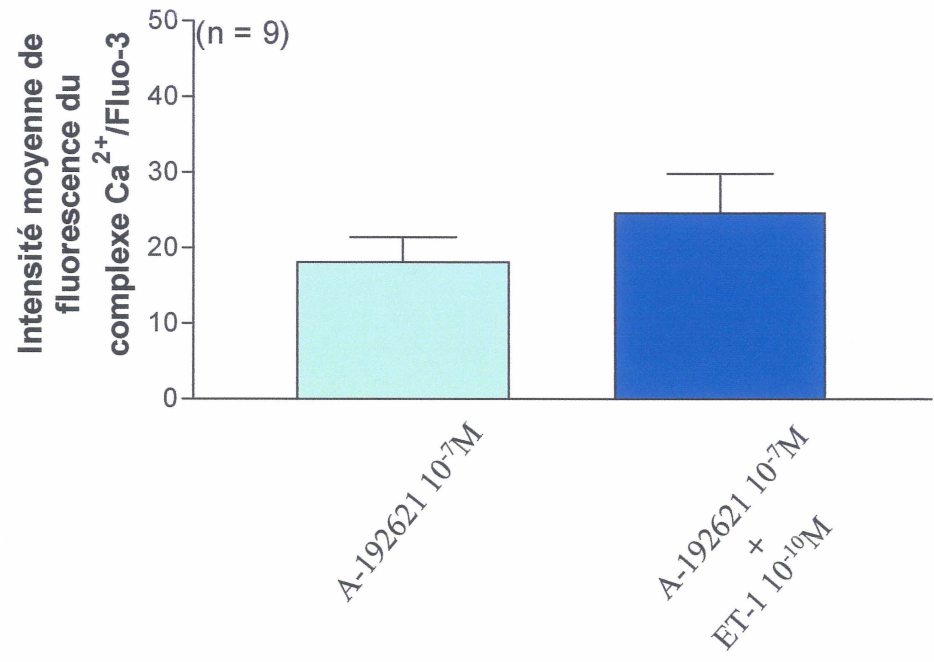


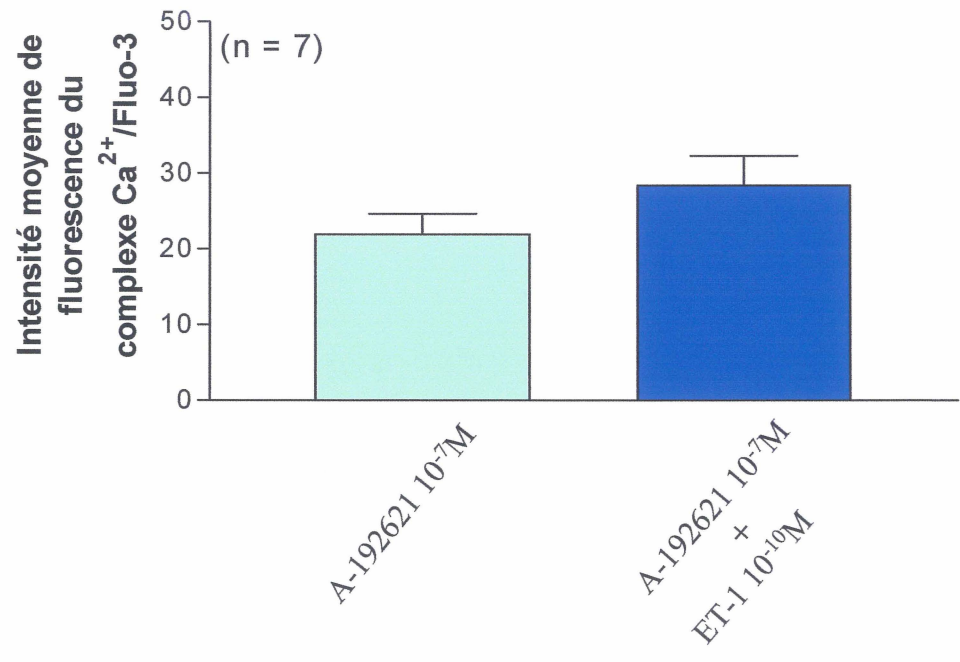
Figure 18 Effet préventif de l'antagoniste du récepteur ET_B, le A-192621 sur l'augmentation du $[Ca^{2+}]_n$ induite par l'ET-1 cytosolique dans les CEEs à membrane plasmique perforée

Ces histogrammes représentent la mesure de l'intensité de fluorescence du $[Ca^{2+}]$ nucléaire dans les CEEGs (A) et les CEEDs (B) isolées de cœurs foetaux humains âgés de 20 semaines dont la membrane plasmique a été perforée à l'ionomycine. En présence de l'antagoniste du récepteur ET_B, le A-192621 ($10^{-7}M$), l'ajout d'ET-1 ($10^{-10}M$) n'a pas induit une augmentation significative du $[Ca^{2+}]_n$ au niveau des CEEGs et des CEEDs. Les valeurs sont représentées comme moyenne \pm erreur standard de la moyenne. Pour les mesures du calcium en 3D, les valeurs de l'intensité de fluorescence calcique nucléaire sont obtenues à partir de cellules reconstruites en 3D, suite à l'enregistrement d'images optiques sériées. «n» est le nombre de cellules de 9 expériences indépendantes pour les CEEGs et de 7 pour les CEEDs.

(A) CEEGs



(B) CEEDs



(n=7). L'ajout subséquent d'ET-1 (10^{-10} M) n'affecte pas le niveau de $[Ca^{2+}]_n$ (28.38 ± 3.90 ; n=7).

Ces résultats suggèrent que le récepteur ET_B est impliqué dans la réponse calcique nucléaire soutenue induite par l'ET-1 cytosolique au niveau des CEEGs et des CEEDs.

3.3 L'ET-1 induit la mobilisation de ses récepteurs dans les CEEGs et les CEEDs

Jacques *et al.* en 2000 a démontré que l'ET-1 extracellulaire pouvait induire une augmentation soutenue du $[Ca^{2+}]_c$ et du $[Ca^{2+}]_n$ dans les CEEs et ce, principalement via l'activation du récepteur ET_A (JACQUES *et al.*, 2000a). De plus, ce groupe a démontré par immunofluorescence indirecte que les récepteurs ET_A sont distribués de façon homogène au niveau de la membrane plasmique, du cytosol et du noyau des CEEGs et des CEEDs. Les récepteurs ET_B sont aussi présents au niveau de la membrane plasmique et du cytosol. Cependant, ils se retrouvent de façon prédominante au niveau du noyau des deux types cellulaires et plus particulièrement au niveau des CEEGs (JACQUES *et al.*, 2005). De plus, il semble que seulement les récepteurs ET_B sont impliqués dans la réponse calcique nucléaire induite par l'ET-1 cytosolique.

Dans cette deuxième partie des résultats, nous avons voulu vérifier si l'ET-1 extracellulaire induit la mobilisation des récepteurs ET_A et/ou ET_B présents au niveau

de la membrane plasmique comme c'est le cas pour la majorité des récepteurs couplés aux protéines G. De plus, nous allons vérifier si l'activation des récepteurs ET_A et/ou ET_B induit une synthèse *de novo* et/ou une dégradation des récepteurs et/ou une translocation de ceux-ci au niveau du noyau des CEEGs et CEEDs, comme il a été démontré pour les récepteurs AT₁ de l'Ang II (BKAILY *et al.*, 2003b) et pour les récepteurs ET_A et ET_B au niveau des cellules du muscle lisse vasculaire humain (CHOUFANI, 2002).

3.3.1 Effet de l'ET-1 extracellulaire sur la mobilisation du récepteur ET_A dans les CEEGs et les CEEDs

Dans cette série d'expériences, les CEEGs et les CEEDs ont été traitées avec l'ET-1 10⁻¹⁰M (une concentration qui induit une augmentation significative du [Ca²⁺] intracellulaire) pendant 1, 2, 5, 7, 10, 15, 20 et 30 minutes afin de vérifier si l'ET-1 extracellulaire stimule la mobilisation du récepteur ET_A. Pour étudier ce phénomène, nous avons utilisé la technique d'immunofluorescence indirecte combinée à la microscopie confocale en 3D. Ces deux méthodes utilisées simultanément permettent de visualiser de façon claire et précise la localisation des récepteurs dans nos cellules intactes.

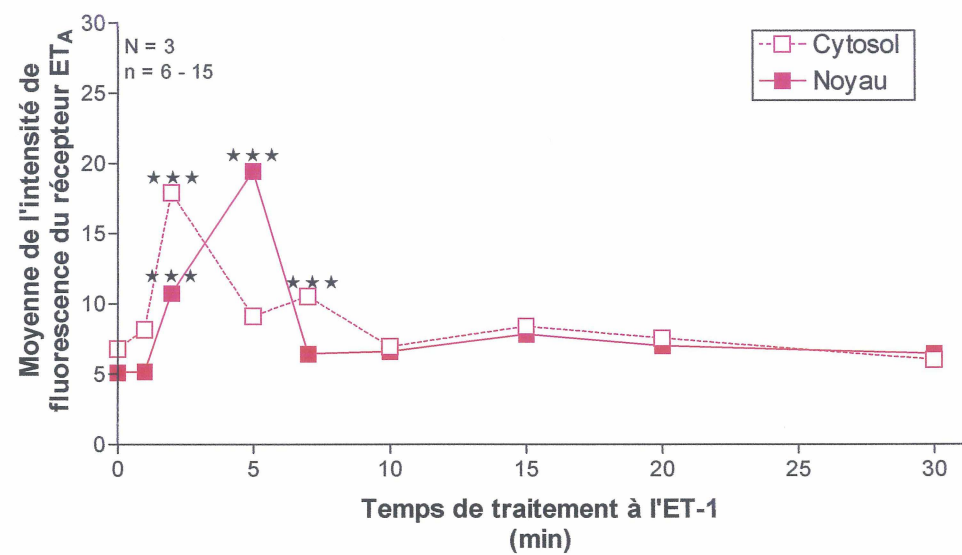
La figure 19 (panneaux A et B) montre la compilation des résultats obtenus pour les CEEGs et les CEEDs respectivement. La figure 19 A montre qu'après 1 min de traitement avec l'ET-1 (10⁻¹⁰M), les niveaux du récepteur ET_A restent près des valeurs contrôles dans les CEEGs (0 min : cytosol : 6.78 ± 0.54; noyau : 5.12 ± 0.62,

Figure 19 Effet de l'ET-1 extracellulaire sur la mobilisation du récepteur ET_A dans les CEEGs et les CEEDs

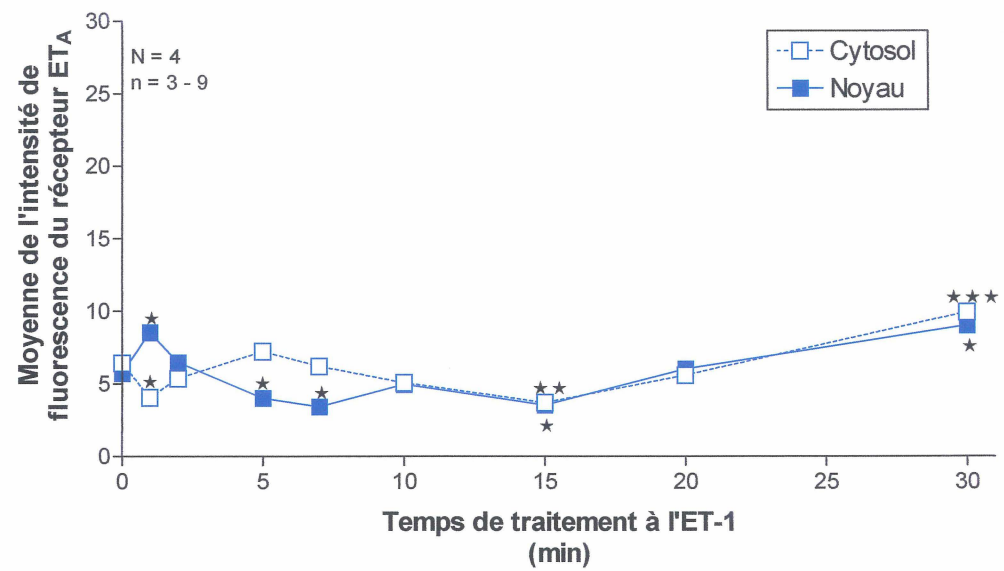
Graphiques montrant la densité relative des récepteurs ET_A au niveau du cytosol et du noyau des CEEGs et des CEEDs suite au traitement à l'ET-1 10⁻¹⁰M. (A) Au niveau des CEEGs, le traitement à l'ET-1 (10⁻¹⁰M) pour 2 min induit une augmentation hautement significative de l'intensité de fluorescence du récepteur ET_A au niveau du cytosol et du noyau par rapport au contrôle. Cette augmentation demeure hautement significative au niveau du noyau après 5 min de traitement alors qu'elle diminue dans le cytosol à des valeurs près du niveau contrôle. Après 7 min de traitement, l'ET-1 induit une augmentation significative de l'intensité de fluorescence du récepteur ET_A au niveau du cytosol tandis que les niveaux du récepteur ET_A au niveau du noyau retournent près des valeurs contrôles. Après 10 min et jusqu'à 30 min de traitement, l'intensité de fluorescence des récepteurs ET_A au niveau des deux compartiments cellulaires retourne près des valeurs contrôles. (B) Au niveau des CEEDs, un traitement avec l'ET-1 (10⁻¹⁰M) pour 1 min induit une diminution significative de l'intensité de fluorescence du récepteur ET_A au niveau du cytosol par rapport au contrôle et une augmentation significative du récepteur au niveau du noyau. Après 5 et 7 min, il y a une diminution significative des niveaux du récepteur au niveau du noyau tandis que les niveaux du récepteur ET_A dans le cytosol retournent vers des valeurs près du contrôle. Après 10 min, les niveaux atteignent des valeurs similaires dans les deux compartiments tandis qu'après 15 min, la densité des récepteurs ET_A diminue dans le cytosol et le noyau. Après 30 min de traitement à l'ET-1, il y a une augmentation significative de l'intensité de fluorescence du récepteur ET_A au niveau du cytosol et du noyau. ★: comparaison au contrôle; ★ p<0.05, ★★p<0.01, ★★★p<0.001. « n » est le nombre de cellules, « N » est le nombre d'expériences.

Récepteur ET_A

(A) CEEGs



(B) CEEDs



n=12; 1 min : cytosol : 8.14 ± 0.60 ; noyau : 10.74 ± 1.29 , n=6). Suite à un traitement de 2 min avec l'ET-1 10^{-10} M, il y a une augmentation hautement significative de l'intensité de fluorescence du récepteur ET_A au niveau du cytosol et du noyau par rapport au contrôle (2 min : cytosol : 17.90 ± 1.24 ; noyau : 10.75 ± 1.29 , n=6, p<0.001). Après 5 min de traitement, cette augmentation reste hautement significative par rapport au contrôle mais seulement au niveau nucléaire tandis que l'intensité de fluorescence du récepteur ET_A au niveau du cytosol retourne près des valeurs contrôles (5 min : cytosol : 9.10 ± 2.09 ; noyau : 19.44 ± 1.21 , n=10, p<0.001). Après 7 min de traitement à l'ET-1, l'intensité de fluorescence du récepteur ET_A au niveau du noyau retourne à des valeurs près du contrôle tandis qu'il y a une augmentation hautement significative de l'intensité de fluorescence du récepteur ET_A au niveau du cytosol par rapport au niveau contrôle (7 min : cytosol : 10.52 ± 0.77 , p<0.001; noyau : 6.44 ± 0.65 , n=10). À partir de 10 min et jusqu'à 30 min de traitement, les valeurs d'intensité de fluorescence du récepteur ET_A au niveau du cytosol et du noyau retournent près des valeurs contrôles (10 min : cytosol : 6.95 ± 0.63 ; noyau : 6.60 ± 0.91 , n=10; 15 min : cytosol : 8.39 ± 0.92 ; noyau : 7.82 ± 1.32 , n=6; 20 min : cytosol : 7.54 ± 1.14 ; noyau : 7.02 ± 0.92 , n=11; 30 min : cytosol : 6.00 ± 0.64 ; noyau : 6.43 ± 1.25 , n=10).

Contrairement à ce qui a été observé pour les CEEGs (figure 19A), la cinétique de mobilisation du récepteur ET_A au niveau des CEEDs (figure 19B) semble être différente. Après 1 minute de traitement à l'ET-1 10^{-10} M, l'intensité de fluorescence du récepteur ET_A diminue de façon significative dans le cytosol tandis

qu'elle augmente significativement au niveau du noyau, et ce, par rapport au contrôle (0 min : cytosol : 6.41 ± 0.51 ; noyau : 5.72 ± 0.69 , $n=9$; 1 min : cytosol : 4.03 ± 0.29 , $n=3$, $p<0.05$; noyau : 8.54 ± 0.39 , $n=3$, $p<0.05$). Après 2 min de traitement, il y a une diminution graduelle de l'intensité de fluorescence du récepteur ET_A au niveau du noyau, et ce, jusqu'à 7 minutes de traitement (2 min : cytosol : 5.35 ± 0.57 , $n=6$; noyau : 6.48 ± 0.70 , $n=6$; 5 min : cytosol : 7.22 ± 0.61 , $n=6$; noyau : 4.01 ± 0.50 , $n=6$, $p<0.05$; 7 min : cytosol : 6.19 ± 0.59 , $n=5$; noyau : 3.42 ± 0.63 , $n=3$, $p<0.05$). Après 10 min de traitement, les niveaux du récepteur ET_A sont similaires au niveau des deux compartiments (10 min : cytosol : 5.06 ± 0.52 , $n=7$; noyau : 4.94 ± 0.54 , $n=6$) tandis qu'après 15 min, ceux-ci diminuent dans le cytosol et le noyau (15 min : cytosol : 3.68 ± 0.38 , $n=6$, $p<0.01$; noyau : 3.54 ± 0.61 , $n=6$, $p<0.05$). Par la suite, il y a une augmentation graduelle de l'intensité de fluorescence du récepteur ET_A au niveau du cytosol et du noyau qui atteint un maximum à 30 minutes (20 min : cytosol : 5.58 ± 0.91 ; noyau : 6.03 ± 0.38 , $n=3$; 30 min : cytosol : 9.92 ± 0.60 , $n=5$, $p<0.001$; noyau : 9.03 ± 0.40 , $n=3$, $p<0.05$).

3.3.2 Effet de la cycloheximide sur la densité des récepteurs ET_A dans les CEEGs et CEEDs prétraitées à l'ET-1

Dans cette série d'expériences, nous avons voulu vérifier si l'augmentation de la densité relative du récepteur ET_A induite par l'ET-1 représente une synthèse *de novo* de ce récepteur. Afin d'étudier ce phénomène, nous avons utilisé la technique d'immunofluorescence indirecte combinée à la microscopie confocale en 3D ainsi

qu'un inhibiteur de synthèse protéique, la cycloheximide (10 µg/ml), qui a été ajoutée 30 min avant l'ajout d'ET-1 10^{-10} M.

La figure 20 montre la compilation des résultats obtenus aux niveaux du cytosol (20A) et du noyau (20B) des CEEGs tandis que les panneaux C et D montrent les résultats obtenus pour le cytosol et le noyau au niveau des CEEDs, respectivement. Nous pouvons constater dans la figure 20A que l'ET-1 (10^{-10} M) induit une augmentation significative de l'intensité de fluorescence du récepteur ET_A au niveau du cytosol après 2 et 7 min de traitement. L'ajout de cycloheximide diminue de 37% et de 41% cette augmentation, respectivement (2 min : sans cyclo : 17.90 ± 1.24 , n=3; avec cyclo : 13.74 ± 0.69 , n=6, p<0.05; 7 min : sans cyclo : 10.52 ± 0.77 , n=10; avec cyclo : 6.33 ± 1.67 , n=4, p<0.05). La figure 20B montre l'augmentation de la densité relative du récepteur ET_A au niveau du noyau des CEEGs traitées à l'ET-1 pendant 2 et 5 minutes. L'ajout de cycloheximide diminue de 34% et de 68% l'intensité de fluorescence du récepteur ET_A respectivement (2 min : sans cyclo : 10.74 ± 1.29 , n=6; avec cyclo : 5.85 ± 1.49 , n=6, p<0.05; 5 min : sans cyclo : 19.44 ± 1.21 , n=3; avec cyclo : 9.67 ± 0.24 , n=5, p<0.001).

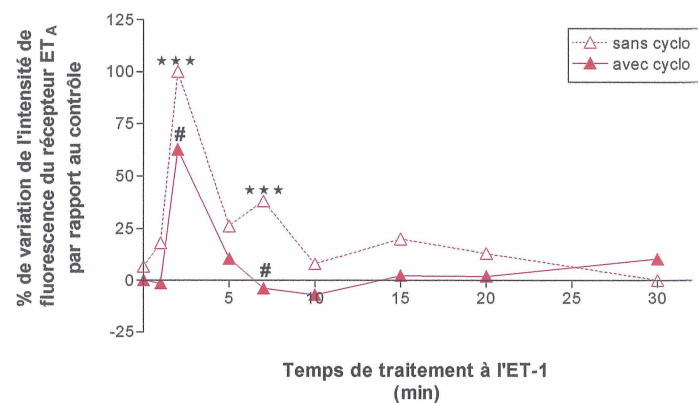
Ces résultats suggèrent qu'au niveau des CEEGs, l'augmentation de l'intensité de fluorescence du récepteur ET_A au niveau du cytosol après 2 et 7 min ainsi qu'au niveau du noyau après 2 et 5 minutes de traitement à l'ET-1 (10^{-10} M) est due à une synthèse protéique *de novo* du récepteur ET_A.

Figure 20 Effet de la cycloheximide sur la densité relative du récepteur ET_A dans les CEEGs et CEEDs traitées à l'ET-1

(A) **CEEGs (cytosol)** : L'ET-1 (10^{-10} M) induit une augmentation de l'intensité de fluorescence du récepteur ET_A après 2 et 7 minutes de traitement qui est diminuée de façon significative par la cycloheximide (10 µg/ml). (B) **CEEGs (noyau)** : Une augmentation de l'intensité de fluorescence du récepteur ET_A est observée suite au traitement à l'ET-1 après 2 et 5 minutes; augmentations qui sont diminuées de façon significative par la cycloheximide. (C) **CEEDs (cytosol)** : Le traitement à l'ET-1 10^{-10} M pendant 30 min induit une augmentation de l'intensité de fluorescence du récepteur ET_A qui est diminuée de façon significative par la cycloheximide. (D) **CEEDs (noyau)** : L'ET-1 10^{-10} M induit une augmentation de l'intensité de fluorescence du récepteur ET_A près des valeurs contrôles après 20 min de traitement et l'ajout de la cycloheximide bloque cette augmentation. Après 30 min de traitement à l'ET-1, une augmentation significative des niveaux du récepteur qui est inhibée de façon significative par la cycloheximide. Les valeurs sont présentées comme pourcentage d'augmentation ou de diminution par rapport au contrôle. ★: comparaison au contrôle; #: comparaison au traitement sans cycloheximide. ★ $p < 0.05$, ★★ $p < 0.01$, ★★★ $p < 0.001$; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$. « n » est le nombre de cellules, « N » est le nombre d'expériences.

(A)

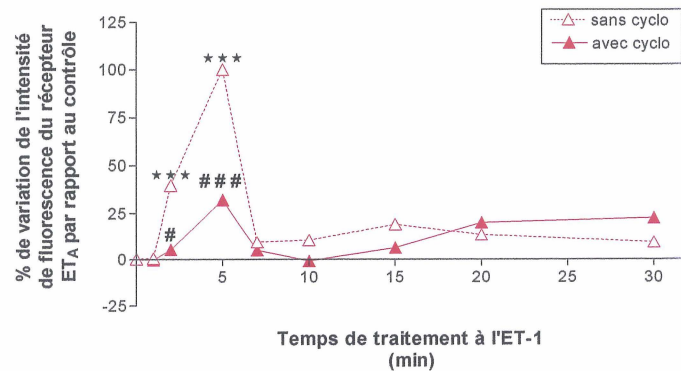
Effet de l'ET-1 (10^{-10} M) sur la densité des récepteurs ET_A dans le cytosol des CEEGs prétraitées à la cycloheximide (30 min - 10 µg/ml)



* : comparaison au contrôle
: comparaison au traitement sans cycloheximide
N = nombre d'expériences = 5
n = nombre de cellules = 3-12

(B)

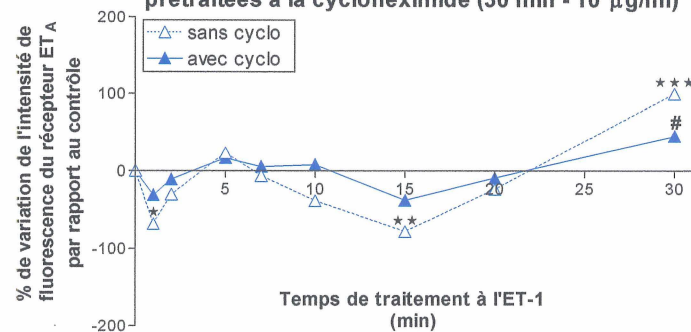
Effet de l'ET-1 (10^{-10} M) sur la densité des récepteurs ET_A dans le noyau des CEEGs prétraitées à la cycloheximide (30 min - 10 µg/ml)



* : comparaison au contrôle
: comparaison au traitement sans cycloheximide
N = nombre d'expériences = 5
n = nombre de cellules = 3-12

(C)

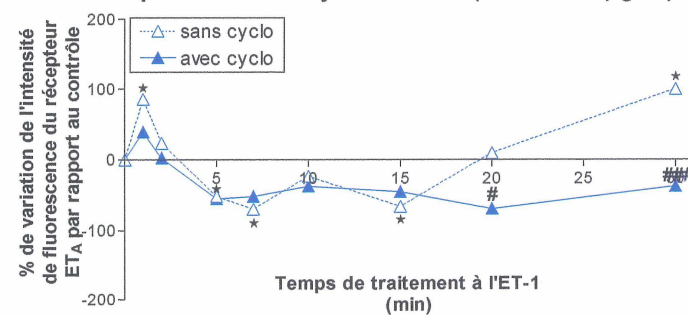
Effet de l'ET-1 (10^{-10} M) sur la densité des récepteurs ET_A dans le cytosol des CEEDs prétraitées à la cycloheximide (30 min - 10 µg/ml)



* : comparaison au contrôle
: comparaison au traitement sans cycloheximide
N = nombre d'expériences = 6
n = nombre de cellules = 3-12

(D)

Effet de l'ET-1 (10^{-10} M) sur la densité des récepteurs ET_A dans le noyau des CEEDs prétraitées à la cycloheximide (30 min - 10 µg/ml)



* : comparaison au contrôle
: comparaison au traitement sans cycloheximide
N = nombre d'expériences = 6
n = nombre de cellules = 3-12

Nous pouvons constater dans la figure 20C qu'au niveau des CEEDs, l'ET-1 (10^{-10} M) induit une augmentation de l'intensité de fluorescence du récepteur ET_A au niveau du cytosol après 30 minutes de traitement et que l'ajout de cycloheximide diminue de 56% les niveaux du récepteur ET_A (30 min : cytosol sans cyclo : 9.92 ± 0.60 , n=5; avec cyclo : 7.98 ± 0.60 , n=5, $p<0.05$). La figure 20D montre qu'il y a une diminution progressive des niveaux du récepteur ET_A au niveau du noyau qui atteint un maximum après 15 min de traitement. Par la suite, il y a une augmentation progressive de l'intensité de fluorescence du récepteur ET_A à des niveaux près du contrôle à 20 min et à des niveaux significativement plus élevés à 30 min. L'ajout de cycloheximide diminue de 78% et de 137% ces augmentations au niveau basal à 20 min et à des niveaux significativement plus élevés à 30 min (15 min : noyau sans cyclo : 3.54 ± 0.61 , n=6; avec cyclo : 4.21 ± 0.99 , n=5; 20 min : noyau sans cyclo : 6.03 ± 0.38 , n=3, avec cyclo : 3.43 ± 0.45 , n=5, $p<0.05$; 30 min : noyau sans cyclo : 9.03 ± 0.39 , n=3; avec cyclo : 4.46 ± 0.67 , n=4, $p<0.001$).

Ces résultats suggèrent que l'augmentation de la densité relative du récepteur ET_A après 30 minutes au niveau du cytosol et après 20 et 30 min au niveau du noyau des CEEDs est due à une synthèse *de novo* induite par l'ET-1.

3.3.3 Effet de l'ET-1 extracellulaire sur la mobilisation du récepteur ET_B dans les CEEGs et les CEEDs

Dans cette série d'expériences, les CEEGs et les CEEDs ont été traitées à l'ET-1 10^{-10} M pendant 1, 2, 5, 7, 10, 15, 20 et 30 minutes afin de vérifier si l'ET-1 extracellulaire stimule la mobilisation du récepteur ET_B. Pour étudier ce phénomène, nous avons utilisé la technique d'immunofluorescence indirecte combinée à la microscopie confocale en 3D.

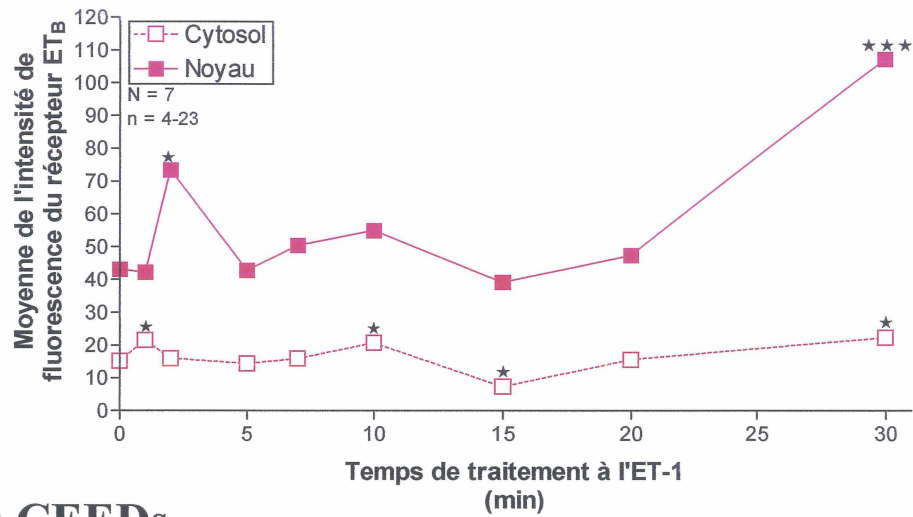
Les figures 21 A et B montrent la compilation des résultats obtenus pour les CEEGs et CEEDs, respectivement. La figure 21A montre qu'en condition contrôle (cellule non-traitée) et après 1 min de traitement avec l'ET-1 10^{-10} M, les niveaux du récepteur ET_B restent près des valeurs contrôles au niveau du cytosol et du noyau des CEEGs (0 min : cytosol : 15.09 ± 1.69 ; noyau : 43.09 ± 6.04 , n=23; 1 min : cytosol : 21.49 ± 3.01 , n=5; noyau : 42.26 ± 6.58 , n=5). Après 1 et 2 min de traitement, il y a une augmentation significative de l'intensité de fluorescence du récepteur ET_B au niveau du cytosol et du noyau respectivement (1 min : cytosol : 21.49 ± 3.01 , n=5; 2 min : noyau : 73.29 ± 5.20 , n=5, $p < 0.01$). Par la suite, les niveaux du récepteur ET_B retournent près des valeurs contrôles (noyau : 5 min : 42.84 ± 1.29 , n=7; 7 min : 50.37 ± 5.91 , n=8; 10 min : 54.99 ± 6.14 , n=16; 15 min : 39.22 ± 2.06 , n=4; 20 min : 47.39 ± 5.44 , n=11). Au niveau du cytosol, les valeurs d'intensité de fluorescence du récepteur ET_B sont près du niveau contrôle (2 min : 15.87 ± 2.99 , n=10; 5 min : 14.36 ± 2.97 , n=6; 7 min : 15.86 ± 2.99 , n=10). Après 10 min de traitement à l'ET-1, il y a augmentation de l'intensité de fluorescence du récepteur ET_B suivie d'une diminution à 15 min (cytosol : 10 min : 20.68 ± 2.94 , n=16, $p < 0.05$; 15 min : 7.38 ± 0.56 , n=4, $p < 0.05$). Après 30 min de traitement, il y a augmentation des niveaux du récepteur

Figure 21 Effet de l'ET-1 extracellulaire sur la mobilisation du récepteur ET_B dans les CEEGs et les CEEDs

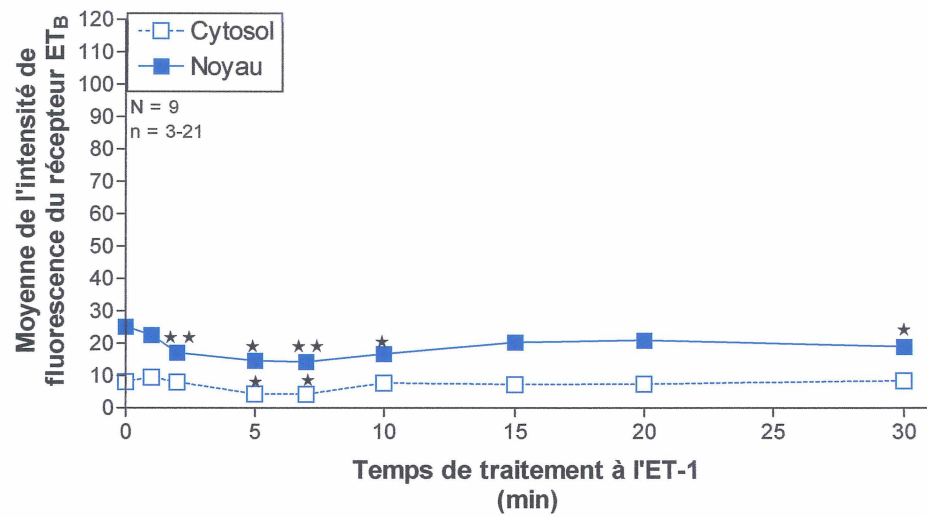
Graphiques montrant la densité relative des récepteurs ET_B au niveau du cytosol et du noyau des CEEGs et des CEEDs suite au traitement à l'ET-1 10^{-10} M. **(A)** Au niveau des CEEGs, un traitement à l'ET-1 (10^{-10} M) pendant 2 min induit une augmentation significative de l'intensité de fluorescence du récepteur ET_B au niveau du noyau par rapport au contrôle. Par la suite, les niveaux du récepteur ET_B retournent près des valeurs contrôles. Après 10 min de traitement, une augmentation significative de l'intensité de fluorescence du récepteur ET_B est observée au niveau du cytosol; augmentation qui est suivie par une diminution significative après 15 min. Après 30 min de traitement à l'ET-1, une augmentation significative de l'intensité de fluorescence du récepteur ET_B est observée au niveau des deux compartiments. **(B)** Au niveau des CEEDs, un traitement avec l'ET-1 (10^{-10} M) pendant 2 min induit une diminution significative de l'intensité de fluorescence du récepteur ET_B dans le noyau et dans les 2 compartiments après 5 min, 7 min et 10 min de traitement (seulement au niveau du noyau). Après 15 min et 20 min, l'intensité de fluorescence du récepteur ET_B retourne vers des valeurs contrôles. Après 30 min de traitement à l'ET-1, une diminution significative de l'intensité de fluorescence du récepteur ET_B est observée au niveau du noyau par rapport au contrôle. Les valeurs sont présentées comme moyennes \pm erreur standard de la moyenne. *: comparaison au contrôle, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. « n » est le nombre de cellules, « N » est le nombre d'expériences.

Récepteur ET_B

(A) CEEGs



(B) CEEDs



ET_B au niveau du cytosol et du noyau des CEEGs (30 min : cytosol : 22.27 ± 2.88 , n=15; noyau : 107.21 ± 6.92 , n=5).

Contrairement à ce qui a été observé pour les CEEGs (figure 21A), la cinétique de mobilisation du récepteur ET_B est différente au niveau des CEEDs (figure 21B). Au niveau des CEEDs, après 1 min de traitement avec l'ET-1 (10^{-10} M), l'intensité de fluorescence du récepteur ET_B au niveau du cytosol et du noyau est près des valeurs contrôles (0 min : cytosol : 8.01 ± 0.92 , n=21; noyau : 25.12 ± 2.51 , n=12; 1 min : cytosol : 9.43 ± 1.58 , n=6; noyau : 22.54 ± 2.43 , n=5). Après 2 min, il y a une diminution progressive de l'intensité de fluorescence du récepteur ET_B au niveau du noyau et après 5 et 7 minutes dans les deux compartiments cellulaires (2 min : cytosol : 7.96 ± 1.16 , n=3; noyau : 17.03 ± 1.43 , n=13, p<0.01; 5 min : cytosol : 4.22 ± 1.12 , n=6, p<0.05; noyau : 14.62 ± 1.91 , n=3, p<0.05; 7 min : cytosol : 4.12 ± 0.76 , n=6, p<0.05; noyau : 14.22 ± 1.69 , n=7, p<0.01). Après 10 minutes, il y a diminution des niveaux du récepteur ET_B au niveau du noyau; les niveaux du récepteur ET_B dans le cytosol retournant près des valeurs contrôles (10 min : cytosol : 7.62 ± 1.41 , n=8; noyau : 10 min : 16.68 ± 1.57 , n=6, p<0.05). À partir de 15 minutes et jusqu'à 20 minutes de traitement, les niveaux du récepteur ET_B au niveau du cytosol et du noyau retournent près des valeurs contrôles (15 min : cytosol : 7.21 ± 0.86 , n=5 ; noyau : 20.21 ± 1.42 , n=5; 20 min : cytosol : 7.30 ± 1.58 , n=16; noyau : 20.84 ± 1.66 , n=8). Après 30 min, il semble y avoir une légère diminution des niveaux du récepteur ET_B seulement au niveau du noyau (30 min : cytosol : 8.36 ± 1.21 , n=15; noyau : 18.89 ± 1.35 , n=7, p<0.05).

3.3.4 Effet de la cycloheximide sur la densité des récepteurs ET_B dans les CEEGs et CEEDs traitées à l'ET-1

Comme nous l'avons fait pour le récepteur ET_A, nous avons voulu vérifier si l'ET-1 induisait une synthèse *de novo* du récepteur ET_B. Afin d'étudier ce phénomène, nous avons utilisé la technique d'immunofluorescence indirecte combinée à la microscopie confocale en 3D ainsi qu'un inhibiteur de la synthèse protéique, la cycloheximide (10 µg/ml), qui a été ajouté 30 min avant l'ajout de l'ET-1 10^{-10} M.

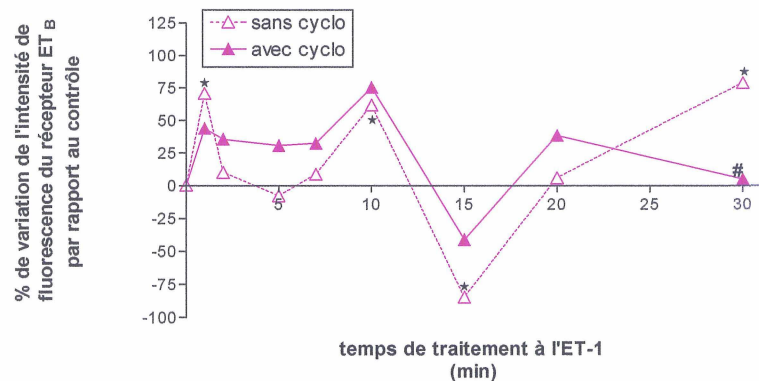
La figure 22 montre la compilation des résultats obtenus au niveau du cytosol (22A) et du noyau (22B) des CEEGs tandis que les panneaux C et D montrent les résultats obtenus au niveau du cytosol et du noyau des CEEDs. Nous pouvons constater dans la figure 22A que le traitement à l'ET-1 (10^{-10} M) induit une augmentation significative de la densité du récepteur ET_B après 1, 10 et 30 min de traitement. L'ajout de la cycloheximide diminue seulement de 75% l'augmentation à 30 min (30 min : cytosol sans cyclo : 22.27 ± 2.88 , n=15; cytosol avec cyclo : 15.52 ± 1.33 , n=10, $p < 0.05$). La figure 22B montre que la cycloheximide diminue de 27% et de 83% l'augmentation de l'intensité de fluorescence du récepteur ET_B après 2 et 30 min (2 min : noyau sans cyclo : 73.30 ± 5.20 , n=5; noyau avec cyclo : 56.08 ± 4.22 , n=4, $p < 0.05$; 30 min : noyau sans cyclo : 107.21 ± 6.92 , n=5; noyau avec cyclo : 54.63 ± 5.10 , n=10, $p < 0.001$). De plus, la cycloheximide diminue

Figure 22 Effet de la cycloheximide sur la densité relative du récepteur ET_B dans les CEEGs et CEEDs prétraitées à l'ET-1

(A) **CEEGs (cytosol)** : L'ET-1 10^{-10} M induit une augmentation significative de l'intensité de fluorescence du récepteur ET_B après 1, 10 et 30 minutes de traitement. Cependant, la cycloheximide diminue l'intensité de fluorescence du récepteur ET_B seulement à 30 min. (B) **CEEGs (noyau)** : L'ET-1 (10^{-10} M) induit une augmentation significative de l'intensité de fluorescence du récepteur ET_B après 2 et 30 minutes de traitement. La cycloheximide diminue de façon significative ces deux augmentations ainsi que l'augmentation à 20 min. (C) **CEEDs (cytosol)** : L'ET-1 (10^{-10} M) induit une diminution progressive de la densité des récepteurs ET_B jusqu'à 7 min de traitement. Par la suite, il y a réaugmentation des niveaux du récepteur ET_B près des valeurs contrôles et ce jusqu'à 30 min. L'ajout de cycloheximide diminue l'intensité de fluorescence du récepteur ET_B après 1 et 30 min de traitement. (D) **CEEDs (noyau)** : Le traitement à l'ET-1 (10^{-10} M) induit une diminution progressive de l'intensité de fluorescence du récepteur ET_B qui atteint un maximum après 7 min. Par la suite, il y a augmentation des niveaux du récepteur ET_B et ce jusqu'à 20 min. Après 30 min, il semble y avoir une légère diminution de la densité du récepteur ET_B. L'ajout de cycloheximide diminue de façon significative les niveaux du récepteur ET_B après 1 et 20 min de traitement. Les valeurs sont présentées comme pourcentage d'augmentation ou de diminution par rapport au contrôle. ★ : comparaison au contrôle; # : comparaison au traitement sans cycloheximide. ★ p<0.05, ★★p<0.01, ★★★p<0.001; # p<0.05, ## p<0.01, ### p<0.001. « n » est le nombre de cellules, « N » est le nombre d'expériences.

(A)

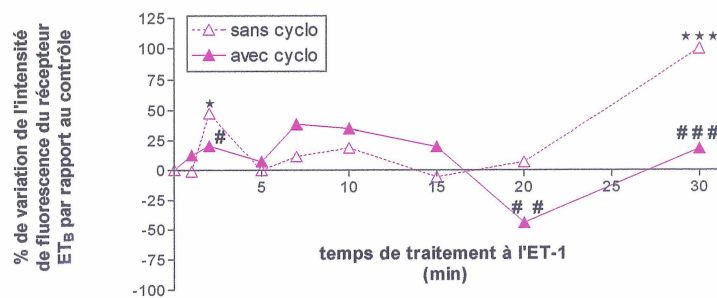
Effet de l'ET-1 (10^{-10} M) sur la densité des récepteurs ET_B dans le cytosol des CEEGs prétraitées à la cycloheximide (30 min - 10 μ g/ml)



* : comparaison au contrôle
: comparaison au traitement sans cycloheximide
N = nombre d'expériences = 6
n = nombre de cellules = 3-23

(B)

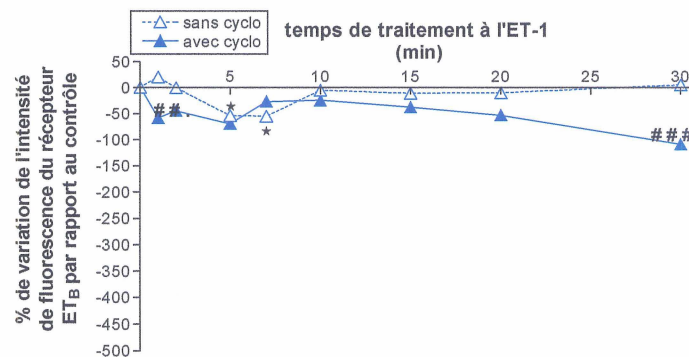
Effet de l'ET-1 (10^{-10} M) sur la densité des récepteurs ET_B dans le noyau des CEEGs prétraitées à la cycloheximide (30 min - 10 μ g/ml)



* : comparaison au contrôle
: comparaison au traitement sans cycloheximide
N = nombre d'expériences = 6
n = nombre de cellules = 3-23

(C)

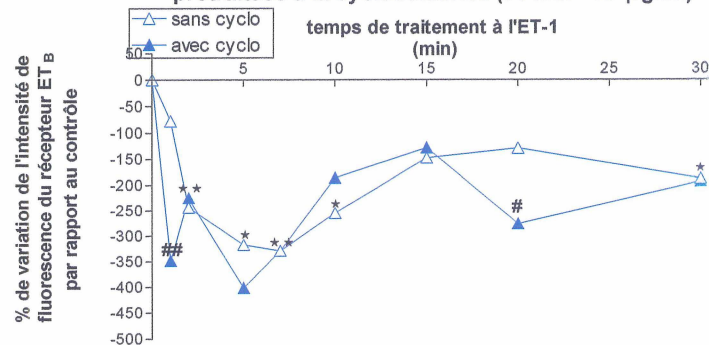
Effet de l'ET-1 (10^{-10} M) sur la densité des récepteurs ET_B dans le cytosol des CEEDs prétraitées à la cycloheximide (30 min - 10 μ g/ml)



* : comparaison au contrôle
: comparaison au traitement sans cycloheximide
N = nombre d'expériences = 6
n = nombre de cellules = 3-21

(D)

Effet de l'ET-1 (10^{-10} M) sur la densité des récepteurs ET_B dans le noyau des CEEDs prétraitées à la cycloheximide (30 min - 10 μ g/ml)



* : comparaison au contrôle
: comparaison au traitement sans cycloheximide
N = nombre d'expériences = 6
n = nombre de cellules = 3-21

de 50% le début de l'augmentation des niveaux du récepteur ET_B après 20 min (20 min : noyau sans cyclo : 47.39 ± 5.44 , n=11; noyau avec cyclo : 14.49 ± 2.26 , n=3, p<0.01).

Ces résultats suggèrent qu'au niveau des CEEGs, l'ET-1 10^{-10} M induit une synthèse *de novo* du récepteur ET_B dans le noyau après 2 minutes et dans les deux compartiments après 30 minutes. De plus, au niveau du noyau, il semble y avoir une synthèse *de novo* afin d'augmenter les niveaux du récepteur ET_B près des valeurs contrôles après 20 minutes de traitement avec l'ET-1.

La figure 22 (panneaux C et D) montre qu'au niveau des CEEs, la cycloheximide diminue de 80% et de 270% l'intensité de fluorescence du récepteur ET_B dans les compartiments cytosolique et nucléaire respectivement après 1 minute de traitement avec l'ET-1 (1 min : cytosol sans cyclo : 9.43 ± 1.58 , n=6; cytosol avec cyclo : 3.93 ± 0.97 , n=10, p<0.01; noyau sans cyclo : 22.54 ± 2.43 , n=5; noyau avec cyclo : 13.57 ± 1.42 , n=9, p<0.01). Nous pouvons aussi voir dans la figure 22C que la cycloheximide diminue de 115% la densité relative du récepteur ET_B après 30 min de traitement avec l'ET-1 (30 min : cytosol sans cyclo : 8.36 ± 1.21 , n=15; 0.36 \pm 1.87, n=7, p<0.001). La figure 22D montre également que la cycloheximide diminue de 147% les niveaux du récepteur ET_B au niveau du noyau et ce seulement après 20 min de traitement (20 min : noyau sans cyclo : 20.84 ± 1.66 , n=8; noyau avec cyclo : 15.97 ± 1.73 , n=10, p<0.05).

Ces résultats suggèrent qu'au niveau des CEEDs, les niveaux du récepteur ET_B induits par l'ET-1 10^{-10} M après 1 minute de traitement au niveau du cytosol et du noyau sont dus à une synthèse *de novo* du récepteur, ce qui a pour effet d'aggraver le phénomène probable de dégradation qui est observé (cytosol et noyau sans cyclo). Au niveau du cytosol, il semble y avoir une synthèse *de novo* après 30 min de traitement avec l'ET-1 car la cycloheximide bloque cet effet. De plus, au niveau du noyau, il semble aussi y avoir synthèse *de novo* qui atteint un maximum après 20 min de traitement avec l'ET-1.

IV-DISCUSSION ET CONCLUSIONS

L'endothélium endocardique (EE) joue un rôle important dans la fonction cardiaque non seulement comme une barrière séparant le sang des cardiomyocytes mais surtout comme un système autocrine et paracrine qui participe à la fonction cardiaque normale ainsi qu'à la dérégulation de la contractilité et la survie des myocytes (revue par BRUTSAERT, 2003). Comme l'endothélium vasculaire, l'EE semble sécréter plusieurs facteurs endothéliaux comme l'ET-1 (MEBAZAA *et al.*, 1993a) et le NO (SHAH, 1996; ANDRIES *et al.*, 1998). De plus, il a été récemment rapporté que les cellules endothéliales endocardiques (CEEs) pouvaient sécréter le NPY (JACQUES *et al.*, 2003b). Notre laboratoire a toutefois démontré que seules les CEEDs ont la capacité de sécréter le NPY en réponse à une dépolarisation soutenue induite par le KCl; les CEEGs étant dépourvues de cette activité sécrétrice du NPY (JACQUES *et al.*, 2003b; SADER, 2002). Ceci a suggéré qu'une différence fonctionnelle est présente entre les CEEGs et les CEEDs. De plus, récemment notre groupe a pu démontrer que le peptide cardioactif ET-1 induit une augmentation soutenue calcique cytosolique et nucléaire qui est relayée principalement via l'activation des récepteurs ET_A de la membrane plasmique des CEEGs et des CEEDs (JACQUES *et al.*, 2000a). Par contre, les valeurs de EC₅₀ pour l'effet de l'ET-1 extracellulaire au niveau des CEEGs par rapport aux CEEDs sont différentes (CEEGs : $\sim 10^{-11}$ M et CEEDs : $\sim 10^{-10}$ M) (JACQUES *et al.*, 2000a). Bien que l'effet de l'ET-1 extracellulaire est relayé principalement par les récepteurs ET_A de la membrane de surface, la densité des récepteurs ET_B est très élevée au niveau nucléaire et le rôle de ce type de récepteur dans la régulation directe de l'homéostasie nucléaire des CEEGs et des CEEDs est inconnu (JACQUES *et al.*, 2005). Dans ce travail de

maîtrise, nous avons pu démontrer que l'ET-1 cytosolique est capable de moduler l'homéostasie calcique nucléaire. Ces résultats confirment que comme dans les cellules du muscle lisse vasculaire humain (BKAILY *et al.*, 2000; CHOUFANI, 2002) et dans les cardiomyocytes d'embryons de poulet (BKAILY *et al.*, 2002), les récepteurs à l'ET-1 présents au niveau des membranes de l'enveloppe nucléaire des CEEGs et des CEEDs sont fonctionnels. Par contre, nos résultats ont montré que les récepteurs présents au niveau des membranes de l'enveloppe nucléaire des CEEGs sont plus sensibles à l'ET-1 que ceux présents au niveau des CEEDs (CEEGs : Noyau (perforé), $EC_{50} = 1.243 \times 10^{-14}M$; CEEDs : Noyau (perforé), $EC_{50} = 5.039 \times 10^{-11}M$).

De plus, nos résultats montrent clairement qu'à l'opposé de l'effet de l'ET-1 sur le Ca^{2+} cytosolique, l'effet de l'ET-1 sur le Ca^{2+} nucléaire des CEEs est relayé via l'activation des récepteurs ET_B des membranes de l'enveloppe nucléaire. Donc, comme il a été proposé pour les cellules du muscle lisse vasculaire humain, l'augmentation du calcium nucléaire induite suite à l'activation des récepteurs à l'ET-1 de la membrane plasmique est due à l'augmentation de Ca^{2+} cytosolique ainsi qu'à l'activation des récepteurs à l'ET-1 des membranes de l'enveloppe nucléaire. Il a été aussi proposé que la différence de sensibilité des récepteurs de l'ET-1 de la membrane plasmique par rapport à ceux des membranes nucléaires pourrait être due en partie à la différence de composition de ces deux types de membrane (BKAILY *et al.*, 2006). Par contre, nos résultats semblent indiquer aussi que cette différence de sensibilité à l'ET-1 peut être due en partie à la présence au niveau des membranes de l'enveloppe nucléaire d'un type de récepteur à l'ET-1 qui est différent de celui de la membrane

plasmique. De plus, cette sensibilité peut aussi être influencée par la densité du récepteur qui semble être plus importante au niveau nucléaire en ce qui concerne le récepteur ET_B (JACQUES *et al.*, 2005). Puisque l'effet de l'ET-1 sur le niveau de calcium libre des noyaux des CEEGs et des CEEDs est relayé via l'activation des récepteurs ET_B et que la densité du récepteur ET_B nucléaire est plus élevée dans les noyaux des CEEGs par rapport aux noyaux des CEEDs, il est donc possible de postuler que la haute sensibilité des CEEGs à l'ET-1 est surtout due à la haute densité des récepteurs ET_B et non seulement à sa présence au niveau des membranes de l'enveloppe nucléaire. La différence de sensibilité à l'ET-1 des CEEGs et des CEEDs confirme davantage qu'une différence existe entre ces deux types d'endothélium non seulement au niveau de la membrane plasmique et ses propriétés sécrétrices (JACQUES *et al.*, 2003b; 2005) mais aussi au niveau des membranes de l'enveloppe nucléaire.

Il est maintenant accepté que l'activation de certains récepteurs couplés aux protéines G de la membrane plasmique induit leur internalisation ainsi que leur translocation nucléaire (BKAILY *et al.*, 2003b; BREMNES *et al.*, 2000; CHOUFANI, 2002; PAASCHE *et al.*, 2001). Ce processus de trafic de récepteur est très souvent accompagné par une synthèse *de novo* au niveau cytosolique et nucléaire (BKAILY *et al.*, 2003b; OKSCHE *et al.*, 2000). Nos résultats ont montré que l'activation des récepteurs ET_A de la membrane plasmique des CEEGs et des CEEDs induit leur mobilisation transcellulaire mais que le profil de mobilisation de ce type de récepteur est différent au niveau des CEEGs par rapport aux CEEDs. Plus précisément, la

mobilisation des récepteurs ET_A dans les CEEDs se manifeste au début et d'une façon simultanée par une diminution cytosolique (incluant la membrane plasmique) accompagnée par une augmentation au niveau nucléaire. Ce phénomène est par la suite suivi d'un retour au niveau basal qui se termine par une diminution nucléaire accompagnée d'une augmentation cytosolique. Cette diminution dans un compartiment qui est accompagnée de façon simultanée par une augmentation dans l'autre compartiment suggère que l'augmentation nucléaire est due à une translocation nucléaire des récepteurs internalisés dans le cytosol. Ce phénomène a été récemment décrit pour le récepteur AT₁ de l'Ang II (BKAILY *et al.*, 2003b). Il est à noter que la cinétique ainsi que le niveau du récepteur ET_A suite à son activation par l'ET-1 n'est pas la même dans les CEEGs par rapport aux CEEDs. Ces résultats montrent clairement qu'à l'opposé des CEEDs, l'activation des récepteurs ET_A de la membrane plasmique induit une augmentation rapide de ce type de récepteur au niveau cytosolique. Par la suite, cette augmentation est suivie par une augmentation des récepteurs ET_A nucléoplasmiques. Cette différence dans la cinétique d'augmentation des récepteurs aux niveaux cytosolique et nucléaire peut être expliquée par une synthèse *de novo* cytosolique. De plus, l'augmentation du niveau des récepteurs ET_A nucléaires est due en partie à la translocation nucléaire des récepteurs cytosoliques (BKAILY *et al.*, 2003b). Il est aussi possible de postuler que l'augmentation rapide (2 ou 5 min) et transitoire des récepteurs ET_A peut être aussi due en partie à l'accélération du processus de maturation des ARNm des récepteurs déjà présents au niveau du cytosol. Ce phénomène doit être vérifié dans le futur.

Nos résultats ont aussi démontré qu'un inhibiteur de la synthèse protéique, la cycloheximide, diminue l'amplitude des variations des récepteurs ET_A au niveau des CEEGs et des CEEDs sans affecter la cinétique de variations de ce type de récepteur. Ces résultats démontrent clairement que l'augmentation du niveau du récepteur ET_A cytosolique et nucléaire induite par l'ET-1 est due à une synthèse *de novo*. Il est à noter qu'une partie de l'augmentation des récepteurs ET_A induite par l'ET-1 est insensible au traitement à la cycloheximide. Ces résultats suggèrent qu'une partie de la synthèse *de novo* est insensible à cet inhibiteur de synthèse protéique et/ou peut être due à la courte durée de traitement (30 min). Ces deux aspects doivent être vérifiés dans le futur.

Comme pour les récepteurs ET_A, nos résultats montrent que l'ET-1 induit aussi la mobilisation du récepteur ET_B dans les CEEDs et les CEEGs. Cette mobilisation se traduit dans les CEEGs par une augmentation rapide suivie d'une période de diminution. Par la suite, il y a une augmentation du niveau de ce type de récepteur. Le profil et la cinétique de mobilisation des récepteurs ET_B dans les CEEGs sont semblables à ce qui a été observé pour les récepteurs ET_A au niveau du même type de CEEs. Ces résultats suggèrent que les phénomènes de mobilisation, de synthèse et de dégradation d'un récepteur suivent un profil bien déterminé indépendamment du type de récepteur. Il est à noter que comme pour le récepteur ET_A des CEEDs, l'ET-1 induit une diminution transitoire du récepteur ET_B cytosolique et nucléaire qui est suivie par une période d'augmentation. Cette similarité des profils de mobilisation des récepteurs ET_A et ET_B dans les CEEDs suggère encore une fois que la cinétique et

que le profil d'internalisation, de dégradation et de synthèse *de novo* peuvent être les mêmes indépendamment du type de récepteur activé. De plus, nos résultats montrent que la cinétique et que le décours de mobilisation des récepteurs ET_A et ET_B sont différents dans les CEEGs par rapport aux CEEDs. Ces résultats suggèrent que la cinétique et le décours de mobilisation du récepteur peuvent dépendre du type de cellules. Ces résultats suggèrent également que même s'il est possible de généraliser sur la mobilisation d'un récepteur dans un type de cellule donné, cette généralité ne peut pas être appliquée lorsqu'il s'agit d'un autre type de cellule. Cette différence entre deux types cellulaires peut s'expliquer par la différence dans la capacité de synthèse et de dégradation et le métabolisme d'un type de cellules par rapport à un autre.

Comme pour les récepteurs ET_A des CEEGs, l'augmentation des récepteurs ET_B induite par l'ET-1 diminue après un traitement avec un bloqueur de synthèse protéique, la cycloheximide. Par contre, dans les CEEDs, ce blocage de synthèse protéique accélère la diminution et bloque l'augmentation induite par l'ET-1 de ce type de récepteur. Ces résultats suggèrent aussi que l'augmentation des récepteurs ET_B dans les CEEs est en bonne partie due à une synthèse *de novo* qui est insensible à un traitement de 30 min à la cycloheximide. Ces résultats montrent clairement que, comme pour le récepteur ET_A, la cinétique et le décours de mobilisation ainsi que les changements de niveaux du récepteur ET_B dépendent du type cellulaire; les CEEDs étant différentes des CEEGs. Cette différence suggère qu'il est important de ne pas considérer que les cellules endothéliales provenant des différentes localisations

anatomiques peuvent se comporter de la même façon. Il est donc important d'étudier un phénomène non seulement en utilisant des CEEGs mais aussi des CEEDs afin de mieux comprendre non seulement la fonction du cœur normal mais aussi le rôle de chaque type de cellule endothéliale endocardique joué dans certaines pathologies cardiaques et systémiques impliquant des facteurs relâchés par l'endothélium endocardique. De plus, nos résultats suggèrent que les CEEs qui se trouvent à deux endroits stratégiques de la circulation, soit l'entrée du sang artériel et la sortie du sang veineux, peuvent y jouer un rôle extrêmement important dans l'ajustement du niveau artériel et veineux de l'ET-1 circulant. Ces résultats suggèrent également qu'un mal fonctionnement de ce type de cellules peut grandement contribuer à des pathologies impliquant l'ET-1 comme l'arythmie et l'hypertrophie cardiaque ainsi que l'hypertension artérielle.

En perspective, il serait important de : 1) Confirmer la différence observée entre les récepteurs de la membrane plasmique et les récepteurs des membranes de l'enveloppe nucléaire en comparant leurs affinités à l'ET-1 par des études de radiolisation sur des noyaux isolés; 2) Confirmer les marquages des récepteurs ETA et ETB obtenus en immunofluorescence indirecte en effectuant des immunobuvardages de type western sur noyaux isolés des CEEs; 3) Déterminer si l'augmentation du niveau des récepteurs ET_A et/ou ET_B au niveau nucléaire est due à une translocation ou à une synthèse *de novo* nucléaire en utilisant des bloqueurs de pore nucléaire; 4) Déterminer le rôle des récepteurs ET_B au niveau nucléaire dans la fonction des CEEs (survie, apoptose, cycle cellulaire).

V-REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier ma directrice de recherche, Dr. Danielle Jacques, pour avoir permis mon immersion dans le monde de la recherche. Ce fût extrêmement formateur au point de vue scientifique mais j'en tire surtout une grande expérience personnelle qui me servira de bagage pour la vie.

Un merci très particulier au Dr. Ghassan Bkaily pour ses discours enflammés qui permettaient une ouverture vers de profondes réflexions et un éveil d'esprit tout en nous permettant de déployer un regard critique.

Ce fût un plaisir de côtoyer mes collègues de laboratoire qui ont chacun apporté une touche particulière assurant la cohésion et le support au groupe :

D'abord, il me serait impossible de débiter sans remercier Ghassan Jr. pour son indispensable assistance technique et pour avoir su s'adapter à mes demandes spéciales tant au niveau des cellules qu'au niveau musical. Je lui lègue également un merci spécial pour l'art de la diplomatie qu'il pratiquait usant de ses fameux et fidèles « tout est sous contrôle » ou encore « il n'y en a aucun problème ». Je le remercie d'avoir montré cette attitude quand il le fallait et je m'efforce d'apprendre de lui;

Je remercie également Claudine pour m'avoir initié aux joies entourant les rudiments du travail avec le calcium et pour les techniques de travail efficaces qu'elle m'a montrées qui étaient, sans contredit, d'un professionnalisme sans égal;

Merci à Chantale pour sa fougue à vouloir organiser des sorties et activités contribuant ainsi à réchauffer l'atmosphère du lab. Je la remercie aussi pour les « talk » reconfortants qui survenaient aux bons moments et pour son Français bien parlé;

Merci à Dima d'être tout simplement restée elle-même; une personne très gentille, aimable et drôle (surtout avec des souris). La côtoyer au quotidien a agrémenté ma vie au labo et elle a été pour moi une source débordante d'espoir;

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude envers Marianne, en qui j'ai découvert une petite sœur qui m'a pourtant tant appris sur moi-même d'abord, puis sur la vie. Je la remercie pour tout le temps de qualité qu'elle m'a accordée mais par-dessus tout je lui suis reconnaissante d'avoir été là quand il le fallait;

Johney et Levon, pour avoir partagé leur humour qui se voulait motivateur. Merci surtout d'avoir conservé cette allure décontractée et relaxe à toute occasion;

Et merci à Lena pour son sourire encourageant.

Également aux étudiants qui ont laissé leur trace:

Moni et Mirna d'avoir apporté une ambiance particulièrement électrisante au labo et d'avoir su partager leur expertise;

Julie, qui m'a toujours fait voir l'aspect burlesque des situations même si elles étaient combien graves et lourdes de vérités permettant ainsi de les alléger. Je la remercie pour ses encouragements et son support sans frontière. Cette expérience m'a permis d'apprécier la valeur d'une très grande amie qui m'a fait découvrir que le rire est un remède à bien des maux.

À tous les membres du département d'anatomie et de biologie cellulaire, un gros merci. J'exprime une pensée spéciale pour les secrétaires, Christiane et Susann, pour les douceurs apportées au département. Je tiens à remercier particulièrement Susann pour sa bonne humeur rehaussante qui s'est manifestée du début à la fin de mon passage.

Je souhaite profondément remercier Jean-Phillippe pour son intarissable pep quotidien mais surtout pour m'avoir aidée à me relever à plusieurs occasions faisant en sorte que je ne pourrais jamais l'oublier.

Mes remerciements les plus profonds vont sans aucun doute à mes parents pour avoir été, malgré eux, l'exemple le plus remarquable de courage, de ténacité et de persévérance que je connaisse. Leur force m'a permis de me surpasser. L'admiration que je porte à leur égard est trop forte pour être exprimée ici.

Merci également à mon oncle Serge et ma tante Yanick ainsi qu'à mes cousins Jr, Joana et surtout Yasmine « a.k.a. Lil Kim » pour avoir rendu mon séjour à Sherbrooke des plus mémorables et pour m'avoir entouré de leur chaleur incomparable et de leurs conseils. L'atmosphère festive qui régnait « in da house » ainsi que leur humour bien développé et adapté à toutes les situations de la vie m'ont grandement fait grandir et aidé à passer à travers bien des choses.

Le surpport financier de ce travail a été assuré par les subventions de recherche du Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie du Canada (CRSNG) pour Dr. Danielle Jacques.

VI-RÉFÉRENCES

- ABDEL-MALAK N.A. (2003) L'angiotensine II et ses récepteurs au niveau des cellules endothéliales endocardiques humaines: Rôle dans la modulation du calcium intracellulaire. Thèse (M.Sc.)--Université de Sherbrooke, *Sherbrooke*, 172p.
- ABE Y., NAKAYAMA K., YAMANAKA A., SAKURAI T. et GOTO K. (2000) Subtype-specific trafficking of endothelin receptors. *J. Biol. Chem.* **275**:8664-8671.
- ABRENICA B., PIERCE G.N. et GILCHRIST J.S. (2003) Nucleoplasmic calcium regulation in rabbit aortic vascular smooth muscle cells. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **81**:301-310.
- ADACHI M., YANG Y.Y., FURUICHI Y. et MIYAMOTO C. (1991) Cloning and characterization of cDNA encoding human A-type endothelin receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **180**:1265-1272.
- ALBERTS G.F., PEIFLEY K.A., JOHNS A., KLEHA J.F. et WINKLES J.A. (1994) Constitutive endothelin-1 overexpression promotes smooth muscle cell proliferation via an external autocrine loop. *J. Biol. Chem.* **269**:10112-10118.
- ALLEN B.G., PHUONG L.L., FARHAT H. et CHEVALIER D. (2003) Both endothelin-A and endothelin-B receptors are present on adult rat cardiac ventricular myocytes. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **81**:95-104.
- ANDRIES L.J. et BRUTSAERT D.L. (1990) Differences in fonctionnal structure between endocardial endothelium and vascular endothelium (abstract). *Eur. Heart. J.* **11**:78.
- ANDRIES L.J., BRUTSAERT D.L. et SYS S.U. (1998) Nonuniformity of endothelial constitutive nitric oxide synthase distribution in cardiac endothelium. *Circ. Res.* **82**:195-203.
- ARAI H., HORI S., ARAMORI I., OHKUBO H. et NAKANISHI S. (1990) Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature* **348**:730-732.
- ARAI H., HOSODA K., SHIRAKAMI G., YOSHIMASA T. et NAKAO K. (1993) Molecular biology of endothelins and endothelin receptors. *Nippon Rinsho* **51**:1530-1539.
- ARTS G.J., KUERSTEN S., ROMBY P., EHREMANN B. et MATTAJ I.W. (1998) The role of exportin-t in selective nuclear export of mature tRNAs. *EMBO J.* **17**:7430-41.
- BALDASSARE J.J., JARPE M.B., ALFERES L. et RABEN D.M. (1997) Nuclear translocation of RhoA mediates the mitogen-induced activation of phospholipase D involved in nuclear envelope signal transduction. *J. Biol. Chem.* **272**:4911-4914.

- BANNON P.G., KIM M.J., DEAN R.T. et DAWES J. (1995) Augmentation of vascular endothelial barrier function by heparin and low molecular weight heparin. *Thromb. Haemost.* **73**:706-712.
- BATTISTINI B., D'ORLEANS-JUSTE P. et SIROIS P. (1993) Endothelins: circulating plasma levels and presence in other biologic fluids. *Lab. Invest.* **68**:600-628.
- BEGHETTI M., BLACK S.M. et FINEMAN J.R. (2005) Endothelin-1 in congenital heart disease. *Pediatr. Res.* **57**:16R-20R.
- BENCHEKROUN M.T., GROS-LOUIS N., BKAILY G. et D'ORLEANS-JUSTE P. (1995) R-type calcium channel involved in endothelin-1-induced contraction of rabbit aorta. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **26 Suppl 3**:S300-2.
- BENY J.L. (1999) Information Networks in the Arterial Wall. *News Physiol. Sci.* **14**:68-73.
- BERRIDGE M.J., BOOTMAN M.D. et RODERICK H.L. (2003) Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**:517-529.
- BHATTACHARYA M., PERI K.G., ALMAZAN G., RIBEIRO-DA-SILVA A., SHICHI H., DUROCHER Y., ABRAMOVITZ M., HOU X., VARMA D.R. et CHEMTOB S. (1998) Nuclear localization of prostaglandin E2 receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**:15792-15797.
- BIGAUD M. et PELTON J.T. (1992) Discrimination between ETA- and ETB-receptor-mediated effects of endothelin-1 and [Ala1,3,11,15]endothelin-1 by BQ-123 in the anaesthetized rat. *Br. J. Pharmacol.* **107**:912-918.
- BKAILY G (1991) Receptor and second messenger modulation of Ca^{2+} and K^{+} channels activity in vascular smooth muscle cells. Dans: *Ion Channels of Vascular Smooth Muscle Cells and Endothelial Cells*. Sperelakis Net Kuriyama H, editeurs. New York: Elsevier, pp. 185-198.
- BKAILY G., ECONOMOS D., POTVIN L., ARDILLOUZE J.L., MARRIOTT C., CORCOS J., BONNEAU D. et FONG C.N. (1992) Blockade of insulin sensitive steady-state R-type Ca^{2+} channel by PN 200-110 in heart and vascular smooth muscle. *Mol. Cell. Biochem.* **117**:93-106.
- BKAILY G., D'ORLEANS-JUSTE P., NAIK R., PERODIN J., STANKOVA J., ABDULNOUR E. et ROLA-PLESZCZYNSKI M. (1993) PAF activation of a voltage-gated R-type Ca^{2+} channel in human and canine aortic endothelial cells. *Br. J. Pharmacol.* **110**:519-520.

BKAILY G (1994a) Biophysical and pharmacological properties of T-, L- and R-Type Ca^{2+} channels. *Dans: Ionic Channels in Vascular Smooth Muscle*. Austin: R.G. Landes Company, pp. 9-21.

BKAILY G (1994b) Regulation of R-type Ca^{2+} channels by insulin and ET-1 in VSM. *Dans: Ionic Channel in Vascular Smooth Muscle*. Bkaily G, editeur. Austin: Molecular Biology Intelligence Unit, pp. 41-52.

BKAILY G (1994c) Regulation of Ca^{2+} channels in VSM by monocyte-released factors. *Dans: Ionic Channel in Vascular Smooth Muscle*. Bkaily G, editeur. Austin: Molecular Biology Intelligence Unit, pp. 53-64.

BKAILY G (1994d) The possible role of Ca^{2+} and K^{+} channels in vascular smooth muscle pathophysiology. *Dans: Ionic Channel in Vascular Smooth Muscle*. Bkaily G, editeur. Austin: Molecular Biology Intelligence Unit, pp. 103-113.

BKAILY G., GROS-LOUIS N., NAIK R., JAALOUK D. et POTHIER P. (1996) Implication of the nucleus in excitation contraction coupling of heart cells. *Mol. Cell. Biochem.* **154**:113-121.

BKAILY G., JAALOUK D., JACQUES D., ECONOMOS D., HASSAN G., SIMAAN M., REGOLI D. et POTHIER P. (1997a) Bradykinin activates R-, T-, and L-type Ca^{2+} channels and induces a sustained increase of nuclear Ca^{2+} in aortic vascular smooth muscle cells. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **75**:652-660.

BKAILY G., POTHIER P., D'ORLEANS-JUSTE P., SIMAAN M., JACQUES D., JAALOUK D., BELZILE F., HASSAN G., BOUTIN C., HADDAD G. et NEUGEBAUER W. (1997b) The use of confocal microscopy in the investigation of cell structure and function in the heart, vascular endothelium and smooth muscle cells. *Mol. Cell. Biochem.* **172**:171-194.

BKAILY G., D'ORLEANS-JUSTE P., POTHIER P., CALIXTO J.B. et YUNES R. (1997c) Nuclear membrane receptors and channels : Potential therapeutical targets for drug action. *Drug Dev. Res.* **42**:211-222.

BKAILY G., NAIK R., JAALOUK D., JACQUES D., ECONOMOS D., D'ORLEANS-JUSTE P. et POTHIER P. (1998) Endothelin-1 and insulin activate the steady-state voltage dependent R-type Ca^{2+} channel in aortic smooth muscle cells via a pertussis toxin and cholera toxin sensitive G-protein. *Mol. Cell. Biochem.* **183**:39-47.

BKAILY G., JACQUES D. et POTHIER P. (1999) Use of confocal microscopy to investigate cell structure and function. *Methods Enzymol.* **307**:119-135.

BKAILY G., CHOUFANI S., HASSAN G., EL-BIZRI N., JACQUES D. et D'ORLEANS-JUSTE P. (2000) Presence of functional endothelin-1 receptors in nuclear membranes of human aortic vascular smooth muscle cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **36**:S414-7.

BKAILY G., MASSAAD D., CHOUFANI S., JACQUES D. et D'ORLEANS-JUSTE P. (2002) Role of endothelin-1 receptors in the sarcolemma membrane and the nuclear membrane in the modulation of basal cytosolic and nuclear calcium levels in heart cells. *Clin. Sci. (Lond)* **103 Suppl 48**:141S-147S.

BKAILY G., CHOUFANI S., SADER S., JACQUES D., D'ORLEANS-JUSTE P., NADER M., KURBAN G. et KAMAL M. (2003a) Activation of sarcolemma and nuclear membranes ET-1 receptors regulates transcellular calcium levels in heart and vascular smooth muscle cells. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **81**:654-662.

BKAILY G., SLEIMAN S., STEPHAN J., ASSELIN C., CHOUFANI S., KAMAL M., JACQUES D., GOBEIL F., JR et D'ORLEANS-JUSTE P. (2003b) Angiotensin II AT₁ receptor internalization, translocation and de novo synthesis modulate cytosolic and nuclear calcium in human vascular smooth muscle cells. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **81**:274-287.

BKAILY G., CHOUFANI S., SADER S., JACQUES D., D'ORLEANS-JUSTE P., NADER M., KURBAN G. et KAMAL M. (2003c) Nuclear membranes channels, exchangers and G-protein coupled receptors: a new target for drug action. *Curr. Top. Pharmacol.* **7**:269-278.

BKAILY G., NADER M., AVEDANIAN L., JACQUES D., PERRAULT C., ABDEL-SAMAD D., D'ORLEANS-JUSTE P., GOBEIL F. et HAZZOURI K.M. (2004) Immunofluorescence revealed the presence of NHE-1 in the nuclear membranes of rat cardiomyocytes and isolated nuclei of human, rabbit, and rat aortic and liver tissues. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **82**:805-811.

BKAILY G., SCULPTOREANU A., WANG S., NADER M., HAZZOURI K.M., JACQUES D., REGOLI D., D'ORLEANS-JUSTE P. et AVEDANIAN L. (2005) Angiotensin II-induced increase of T-type Ca²⁺ current and decrease of L-type Ca²⁺ current in heart cells. *Peptides* **26**:1410-1417.

BKAILY G., NADER M., AVEDANIAN L., CHOUFANI S., JACQUES D., D'ORLEANS-JUSTE P., GOBEIL F., CHEMTOB S. et AL-KHOURY J. (2006) G-protein-coupled receptors, channels, and Na⁺-H⁺ exchanger in nuclear membranes of heart, hepatic, vascular endothelial, and smooth muscle cells. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **84**:431-441.

BLAIS V., FUGERE M., DENAULT J.B., KLARSKOV K., DAY R. et LEDUC R. (2002) Processing of proendothelin-1 by members of the subtilisin-like pro-protein convertase family. *FEBS Lett.* **524**:43-48.

- BOBIK A., GROOMS A., MILLAR J.A., MITCHELL A. et GRINPUKEL S. (1990) Growth factor activity of endothelin on vascular smooth muscle. *Am. J. Physiol.* **258**:C408-15.
- BOIVIN B., CHEVALIER D., VILLENEUVE L.R., ROUSSEAU E. et ALLEN B.G. (2003) Functional endothelin receptors are present on nuclei in cardiac ventricular myocytes. *J. Biol. Chem.* **278**:29153-29163.
- BOIVIN B., VILLENEUVE L.R., FARHAT N., CHEVALIER D. et ALLEN B.G. (2005) Sub-cellular distribution of endothelin signaling pathway components in ventricular myocytes and heart: lack of preformed caveolar signalosomes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **38**:665-676.
- BOLTON T.B. (1979) Mechanisms of action of transmitters and other substances on smooth muscle. *Physiol. Rev.* **59**:606-718.
- BOOZ G.W., CONRAD K.M., HESS A.L., SINGER H.A. et BAKER K.M. (1992) Angiotensin-II-binding sites on hepatocyte nuclei. *Endocrinology* **130**:3641-3649.
- BREMNES T., PAASCHE J.D., MEHLUM A., SANDBERG C., BREMNES B. et ATTRAMADAL H. (2000) Regulation and intracellular trafficking pathways of the endothelin receptors. *J. Biol. Chem.* **275**:17596-17604.
- BREUILLER-FOUCHE M., HELUY V., FOURNIER T., DALLOT E., VACHER-LAVENU M.C. et FERRE F. (1998) Role of endothelin-1 in regulating proliferation of cultured human uterine smooth muscle cells. *Mol. Hum. Reprod.* **4**:33-39.
- BRISMAR H., ASGHAR M., CAREY R.M., GREENGARD P. et APERIA A. (1998) Dopamine-induced recruitment of dopamine D1 receptors to the plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**:5573-5578.
- BRUNNER F., BRAS-SILVA C., CERDEIRA A.S. et LEITE-MOREIRA A.F. (2006) Cardiovascular endothelins: essential regulators of cardiovascular homeostasis. *Pharmacol. Ther.* **111**:508-531.
- BRUTSAERT D.L., MEULEMANS A.L., SIPIDO K.R. et SYS S.U. (1988) Endocardial control of myocardial performance. *Adv. Exp. Med. Biol.* **226**:609-615.
- BRUTSAERT D.L. (1989) The endocardium. *Annu. Rev. Physiol.* **51**:263-273.
- BRUTSAERT D.L. et ANDRIES L.J. (1992) The endocardial endothelium. *Am. J. Physiol.* **263**:H985-1002.

BRUTSAERT D.L., DE KEULENAER G.W., FRANSEN P., MOHAN P., KALUZA G.L., ANDRIES L.J., ROULEAU J.L. et SYS S.U. (1996) The cardiac endothelium: functional morphology, development, and physiology. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **39**:239-262.

BRUTSAERT D.L., FRANSEN P., ANDRIES L.J., DE KEULENAER G.W. et SYS S.U. (1998) Cardiac endothelium and myocardial function. *Cardiovasc. Res.* **38**:281-290.

BRUTSAERT D.L. (2003) Cardiac endothelial-myocardial signaling: its role in cardiac growth, contractile performance, and rhythmicity. *Physiol. Rev.* **83**:59-115.

BUSSE R., LUCKHOFF A. et MULSCH A. (1991) Cellular mechanisms controlling EDRF/NO formation in endothelial cells. *Basic Res. Cardiol.* **86 Suppl 2**:7-16.

CATTERALL W.A., PEREZ-REYES E., SNUTCH T.P. et STRIESSNIG J. (2005) International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol. Rev.* **57**:411-425.

CHEN R., MUKHIN Y.V., GARNOVSKAYA M.N., THIELEN T.E., IIJIMA Y., HUANG C., RAYMOND J.R., ULLIAN M.E. et PAUL R.V. (2000) A functional angiotensin II receptor-GFP fusion protein: evidence for agonist-dependent nuclear translocation. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **279**:F440-8.

CHOUFANI S. (2002) L'endothéline-1 module le calcium cytosolique et nucléaire ainsi que la prolifération cellulaire et l'apoptose des cellules du muscle lisse aortique humain. Thèse (Ph.D.)--Université de Sherbrooke, *Sherbrooke*, 262p.

CHUN M., LIYANAGE U.K., LISANTI M.P. et LODISH H.F. (1994) Signal transduction of a G protein-coupled receptor in caveolae: colocalization of endothelin and its receptor with caveolin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**:11728-11732.

CHUN M., LIN H.Y., HENIS Y.I. et LODISH H.F. (1995) Endothelin-induced endocytosis of cell surface ETA receptors. Endothelin remains intact and bound to the ETA receptor. *J. Biol. Chem.* **270**:10855-10860.

CLAPHAM D.E. (1995) Intracellular calcium. Replenishing the stores. *Nature* **375**:634-635.

CLAUDE P. et GOODENOUGH D.A. (1973) Fracture faces of zonulae occludentes from "tight" and "leaky" epithelia. *J. Cell Biol.* **58**:390-400.

CLOZEL M. et GRAY G.A. (1995) Are there different ETB receptors mediating constriction and relaxation? *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **26 Suppl 3**:S262-4.

CRISTOL J.P., WARNER T.D., THIEMERMANN C. et VANE J.R. (1993) Mediation via different receptors of the vasoconstrictor effects of endothelins and sarafotoxins in the systemic circulation and renal vasculature of the anaesthetized rat. *Br. J. Pharmacol.* **108**:776-779.

CROUCH M.F. et SIMSON L. (1997) The G-protein G(i) regulates mitosis but not DNA synthesis in growth factor-activated fibroblasts: a role for the nuclear translocation of G(i). *FASEB J.* **11**:189-198.

DAI Z.K., TAN M.S., CHAI C.Y., YEH J.L., CHOU S.H., CHIU C.C., JENG A.Y., CHEN I.J. et WU J.R. (2004) Upregulation of endothelial nitric oxide synthase and endothelin-1 in pulmonary hypertension secondary to heart failure in aorta-banded rats. *Pediatr. Pulmonol.* **37**:249-256.

DAVENPORT A.P., NUNEZ D.J., HALL J.A., KAUMANN A.J. et BROWN M.J. (1989) Autoradiographical localization of binding sites for porcine [125I]endothelin-1 in humans, pigs, and rats: functional relevance in humans. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **13 Suppl 5**:S166-70.

DAVENPORT A.P. (2002) International Union of Pharmacology. XXIX. Update on endothelin receptor nomenclature. *Pharmacol. Rev.* **54**:219-226.

DE GOTTARDI A., SHAW S., SAGESSER H. et REICHEN J. (2000) Type A, but not type B, endothelin receptor antagonists significantly decrease portal pressure in portal hypertensive rats. *J. Hepatol.* **33**:733-737.

DE NUCCI G., THOMAS R., D'ORLEANS-JUSTE P., ANTUNES E., WALDER C., WARNER T.D. et VANE J.R. (1988) Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**:9797-9800.

DENAULT J.B., CLAING A., D'ORLEANS-JUSTE P., SAWAMURA T., KIDO T., MASAKI T. et LEDUC R. (1995) Processing of proendothelin-1 by human furin convertase. *FEBS Lett.* **362**:276-280.

DESCORBETH M. (2003) L'endothéline-1 et ses récepteurs au niveau des cellules endothéliales endocardiques humaines : rôle dans la modulation du calcium intracellulaire. Thèse (M.Sc.)--Université de Sherbrooke, *Sherbrooke*, 169p.

DONG F., ZHANG X., WOLD L.E., REN Q., ZHANG Z. et REN J. (2005) Endothelin-1 enhances oxidative stress, cell proliferation and reduces apoptosis in human umbilical vein endothelial cells: role of ETB receptor, NADPH oxidase and caveolin-1. *Br. J. Pharmacol.* **145**:323-333.

- D'ORLEANS-JUSTE P., CLAING A., REGOLI D., SIROIS P. et PLANTE G.E. (1996) Endothelial and smooth muscle pharmacology of pre- and post-capillary microcirculation: correlation with plasma extravasation. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **54**:31-37.
- D'ORLEANS-JUSTE P., PLANTE M., HONORE J.C., CARRIER E. et LABONTE J. (2003) Synthesis and degradation of endothelin-1. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **81**:503-510.
- DOUGLAS S.A., BECK G.R.,JR, ELLIOTT J.D. et OHLSTEIN E.H. (1995) Pharmacological evidence for the presence of three distinct functional endothelin receptor subtypes in the rabbit lateral saphenous vein. *Br. J. Pharmacol.* **114**:1529-1540.
- DOUGLAS S.A. et OHLSTEIN E.H. (1997) Signal transduction mechanisms mediating the vascular actions of endothelin. *J. Vasc. Res.* **34**:152-164.
- D'SANTOS C.S., CLARKE J.H. et DIVECHA N. (1998) Phospholipid signalling in the nucleus. Een DAG uit het leven van de inositide signaling in de nucleus. *Biochim. Biophys. Acta* **1436**:201-232.
- EBIHARA Y., HAIST J.V. et KARMAZYN M. (1996) Modulation of endothelin-1 effects on rat hearts and cardiomyocytes by nitric oxide and 8-bromo cyclic GMP. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **28**:265-277.
- EGGENA P., ZHU J.H., CLEGG K. et BARRETT J.D. (1993) Nuclear angiotensin receptors induce transcription of renin and angiotensinogen mRNA. *Hypertension* **22**:496-501.
- ELLIOTT J.D., LAGO M.A., COUSINS R.D., GAO A., LEBER J.D., ERHARD K.F., NAMBI P., ELSHOURBAGY N.A., KUMAR C. et LEE J.A. (1994) 1,3-Diarylindan-2-carboxylic acids, potent and selective non-peptide endothelin receptor antagonists. *J. Med. Chem.* **37**:1553-1557.
- FERGUSON S.S. (2001) Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol. Rev.* **53**:1-24.
- FILIPPATOS G.S., GANGOPADHYAY N., LALUDE O., PARAMESWARAN N., SAID S.I., SPIELMAN W. et UHAL B.D. (2001) Regulation of apoptosis by vasoactive peptides. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **281**:L749-61.
- FISHER T.E. et BOURQUE C.W. (2001) The function of Ca(2+) channel subtypes in exocytotic secretion: new perspectives from synaptic and non-synaptic release. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **77**:269-303.

- FONG G.H., ROSSANT J., GERTSENSTEIN M. et BREITMAN M.L. (1995) Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* **376**:66-70.
- FRANK H.J., LEVIN E.R., HU R.M. et PEDRAM A. (1993) Insulin stimulates endothelin binding and action on cultured vascular smooth muscle cells. *Endocrinology* **133**:1092-1097.
- FRANSEN P.F., DEMOLDER M.J. et BRUTSAERT D.L. (1995) Whole cell membrane currents in cultured pig endocardial endothelial cells. *Am. J. Physiol.* **268**:H2036-47.
- FURCHGOTT R.F. et ZAWADZKI J.V. (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **288**:373-376.
- FUKURODA T., FUJIKAWA T., OZAKI S., ISHIKAWA K., YANO M. et NISHIKIBE M. (1994) Clearance of circulating endothelin-1 by ETB receptors in rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **199**:1461-1465.
- GAVAGHAN M. (1998) Cardiac anatomy and physiology: a review. *AORN J.* **67**:802-822.
- GERASIMENKO O.V., GERASIMENKO J.V., TEPIKIN A.V. et PETERSEN O.H. (1995) ATP-dependent accumulation and inositol trisphosphate- or cyclic ADP-ribose-mediated release of Ca²⁺ from the nuclear envelope. *Cell* **80**:439-444.
- GERASIMENKO O.V., GERASIMENKO J.V., TEPIKIN A.V. et PETERSEN O.H. (1996) Calcium transport pathways in the nucleus. *Pflugers Arch.* **432**:1-6.
- GHONEIM M.A., YAMAMOTO T., HIROSE S., NAGASAWA T. et HAGIWARA H. (1993) Endothelium localization of ETB receptor revealed by immunohistochemistry. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **22 Suppl 8**:S111-112.
- GIAID A., SALEH D., YANAGISAWA M. et FORBES R.D. (1995) Endothelin-1 immunoreactivity and mRNA in the transplanted human heart. *Transplantation* **59**:1308-1313.
- GILCHRIST M., HESSLINGER C. et BEFUS A.D. (2003) Tetrahydrobiopterin, a critical factor in the production and role of nitric oxide in mast cells. *J. Biol. Chem.* **278**:50607-50614.

- GOBEIL F.,JR, DUMONT I., MARRACHE A.M., VAZQUEZ-TELLO A., BERNIER S.G., ABRAN D., HOU X., BEAUCHAMP M.H., QUINIOU C., BOUAYAD A., CHOUFANI S., BHATTACHARYA M., MOLOTCHNIKOFF S., RIBEIRO-DA-SILVA A., VARMA D.R., BKAILY G. et CHEMTOB S. (2002) Regulation of eNOS expression in brain endothelial cells by perinuclear EP(3) receptors. *Circ. Res.* **90**:682-689.
- GOBEIL F., FORTIER A., ZHU T., BOSSOLASCO M., LEDUC M., GRANDBOIS M., HEVEKER N., BKAILY G., CHEMTOB S. et BARBAZ D. (2006) G-protein-coupled receptors signalling at the cell nucleus: an emerging paradigm. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **84**:287-297.
- GOMES D.A., LEITE M.F., BENNETT A.M. et NATHANSON M.H. (2006) Calcium signaling in the nucleus. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **84**:325-332.
- GOTO K., HAMA H. et KASUYA Y. (1996) Molecular pharmacology and pathophysiological significance of endothelin. *Jpn. J. Pharmacol.* **72**:261-290.
- GOTO K. (2001) Basic and therapeutic relevance of endothelin-mediated regulation. *Biol. Pharm. Bull.* **24**:1219-1230.
- GRAIER W.F., GROSCHNER K., SCHMIDT K. et KUKOVETZ W.R. (1992) Increases in endothelial cyclic AMP levels amplify agonist-induced formation of endothelium-derived relaxing factor (EDRF). *Biochem. J.* **288 (Pt 2)**:345-349.
- GRANT G.A., ABBOTT N.J. et JANIGRO D. (1998) Understanding the Physiology of the Blood-Brain Barrier: In Vitro Models. *News Physiol. Sci.* **13**:287-293.
- GRAY G.A. et WEBB D.J. (1996) The endothelin system and its potential as a therapeutic target in cardiovascular disease. *Pharmacol. Ther.* **72**:109-148.
- GRIENDLING K.K., TSUDA T. et ALEXANDER R.W. (1989) Endothelin stimulates diacylglycerol accumulation and activates protein kinase C in cultured vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **264**:8237-8240.
- GRIMSHAW M.J., NAYLOR S. et BALKWILL F.R. (2002) Endothelin-2 is a hypoxia-induced autocrine survival factor for breast tumor cells. *Mol. Cancer. Ther.* **1**:1273-1281.
- HAEGERSTRAND A., HEMSEN A., GILLIS C., LARSSON O. et LUNDBERG J.M. (1989) Endothelin:presence in human umbilical vessels, high levels in fetal blood and potent constrictor effect. *Acta. Physiol. Scand.* **137**:541-2.
- HAGIWARA H., NAGASAWA T., YAMAMOTO T., LODHI K.M., ITO T., TAKEMURA N. et HIROSE S. (1993) Immunochemical characterization and localization of endothelin ETB receptor. *Am. J. Physiol.* **264**:R777-83.

HAYNES W.G. et WEBB D.J. (1998) Endothelin as a regulator of cardiovascular function in health and disease. *J. Hypertens.* **16**:1081-1098.

HE J.Q., PI Y., WALKER J.W. et KAMP T.J. (2000) Endothelin-1 and photoreleased diacylglycerol increase L-type Ca^{2+} current by activation of protein kinase C in rat ventricular myocytes. *J. Physiol.* **524 Pt 3**:807-820.

HEMSEN A., LARSSON O. et LUNDBERG J.M. (1991) Characteristics of endothelin A and B binding sites and their vascular effects in pig peripheral tissues. *Eur. J. Pharmacol.* **208**:313-322.

HENTZE M.W. (2001) Protein synthesis. Believe it or not-translation in the nucleus. *Science* **293**:1058-1059.

HICKEY K.A., RUBANYI G., PAUL R.J. et HIGHSMITH R.F. (1985) Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells. *Am. J. Physiol.* **248**:C550-6.

HILAL-DANDAN R., MERCK D.T., LUJAN J.P. et BRUNTON L.L. (1994) Coupling of the type A endothelin receptor to multiple responses in adult rat cardiac myocytes. *Mol. Pharmacol.* **45**:1183-1190.

HIRAKAWA T., GALET C., KISHI M. et ASCOLI M. (2003) GIPC binds to the human lutropin receptor (hLHR) through an unusual PDZ domain binding motif, and it regulates the sorting of the internalized human choriogonadotropin and the density of cell surface hLHR. *J. Biol. Chem.* **278**:49348-49357.

HIRATA Y., YOSHIMI H., TAKATA S., WATANABE T.X., KUMAGAI S., NAKAJIMA K. et SAKAKIBARA S. (1988) Cellular mechanism of action by a novel vasoconstrictor endothelin in cultured rat vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **154**:868-875.

HIRATA Y., EMORI T., EGUCHI S., KANNO K., IMAI T., OHTA K. et MARUMO F. (1993) Endothelin receptor subtype B mediates synthesis of nitric oxide by cultured bovine endothelial cells. *J. Clin. Invest.* **91**:1367-1373.

HOCHER B., RUBENS C., HENSEN J., GROSS P. et BAUER C. (1992) Intracellular distribution of endothelin-1 receptors in rat liver cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **184**:498-503.

HONORE J.C., FECTEAU M.H., BROCHU I., LABONTE J., BKAILY G. et D'ORLEANS-JUSTE P. (2005) Concomitant antagonism of endothelial and vascular smooth muscle cell ETB receptors for endothelin induces hypertension in the hamster. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **289**:H1258-64.

HORI M., SATO K., SAKATA K., OZAKI H., TAKANO-OHMURO H., TSUCHIYA T., SUGI H., KATO I. et KARAKI H. (1992) Receptor agonists induce myosin phosphorylation-dependent and phosphorylation-independent contractions in vascular smooth muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **261**:506-512.

HORSTMAYER A., CRAMER H., SAUER T., MULLER-ESTERL W. et SCHROEDER C. (1996) Palmitoylation of endothelin receptor A. Differential modulation of signal transduction activity by post-translational modification. *J. Biol. Chem.* **271**:20811-20819.

HOSEY M.M. et LAZDUNSKI M. (1988) Calcium channels: molecular pharmacology, structure and regulation. *J. Membr. Biol.* **104**:81-105.

HOWARD P.G., PLUMPTON C. et DAVENPORT A.P. (1992) Anatomical localization and pharmacological activity of mature endothelins and their precursors in human vascular tissue. *J. Hypertens.* **10**:1379-1386.

HOYER J., DISTLER A., HAASE W. et GOGELIN H. (1994) Ca²⁺ influx through stretch-activated cation channels activates maxi K⁺ channels in porcine endocardial endothelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**:2367-2371.

HUNLEY T.E. et KON V. (2001) Update on endothelins - biology and clinical implications. *Pediatr. Nephrol.* **16**:752-762.

HYNYNEN M.M. et KHALIL R.A. (2006) The Vascular Endothelin System in Hypertension - Recent Patents and Discoveries. *Recent. Pat. Cardiovas Drug Discov.* **1**:95-108.

IBORRA F.J., JACKSON D.A. et COOK P.R. (2001) Coupled transcription and translation within nuclei of mammalian cells. *Science* **293**:1139-1142.

IHARA M., NOGUCHI K., SAEKI T., FUKURODA T., TSUCHIDA S., KIMURA S., FUKAMI T., ISHIKAWA K., NISHIKIBE M. et YANO M. (1992) Biological profiles of highly potent novel endothelin antagonists selective for the ETA receptor. *Life Sci.* **50**:247-255.

INAGAMI T., NARUSE M. et HOOVER R. (1995) Endothelium as an endocrine organ. *Annu. Rev. Physiol.* **57**:171-189.

INOUE A., YANAGISAWA M., KIMURA S., KASUYA Y., MIYAUCHI T., GOTO K. et MASAKI T. (1989) The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**:2863-2867.

IOUZALEN L., LANTOINE F., PERNOLLET M.G., MILLANVOYE-VAN BRUSSEL E., DEVYNCK M.A. et DAVID-DUFILHO M. (1996) SK&F 96365 inhibits intracellular Ca^{2+} pumps and raises cytosolic Ca^{2+} concentration without production of nitric oxide and von Willebrand factor. *Cell Calcium* **20**:501-508.

IQBAL J., SANGHIA R. et DAS S.K. (2005) Endothelin receptor antagonists: an overview of their synthesis and structure-activity relationship. *Mini Rev. Med. Chem.* **5**:381-408.

ISHIKAWA K., IHARA M., NOGUCHI K., MASE T., MINO N., SAEKI T., FUKURODA T., FUKAMI T., OZAKI S. et NAGASE T. (1994) Biochemical and pharmacological profile of a potent and selective endothelin B-receptor antagonist, BQ-788. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**:4892-4896.

JACQUES D., SADER S., CHOUFANI S., D'ORLEANS-JUSTE P. et CHAREST D. (2000a) Endothelin-1 regulates cytosolic and nuclear Ca^{2+} in human endocardial endothelium. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **36**:S397-400.

JACQUES D., SADER S., EL-BIZRI N., CHOUFFANI S., HASSAN G. et SHBAKLO H. (2000b) Neuropeptide Y induced increase of cytosolic and nuclear Ca^{2+} in heart and vascular smooth muscle cells. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **78**:162-172.

JACQUES D., ABDEL MALAK N.A., SADER S. et PERREAULT C. (2003a) Angiotensin II and its receptors in human endocardial endothelial cells: role in modulating intracellular calcium. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **81**:259-266.

JACQUES D., SADER S., PERREAULT C., FOURNIER A., PELLETIER G., BECK-SICKINGER A.G. et DESCORBETH M. (2003b) Presence of neuropeptide Y and the Y1 receptor in the plasma membrane and nuclear envelope of human endocardial endothelial cells: modulation of intracellular calcium. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **81**:288-300.

JACQUES D., DESCORBETH M., ABDEL-SAMAD D., PROVOST C., PERREAULT C. et JULES F. (2005) The distribution and density of ET-1 and its receptors are different in human right and left ventricular endocardial endothelial cells. *Peptides* **26**:1427-1435.

JACQUES D., SADER S., PERREAULT C., ABDEL-SAMAD D. et PROVOST C. (2006a) Roles of nuclear NPY and NPY receptors in the regulation of the endocardial endothelium and heart function. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **84**:695-705.

JACQUES D., SADER S., PERREAULT C., ABDEL-SAMAD D., JULES F. et PROVOST C. (2006b) NPY, ET-1, and Ang II nuclear receptors in human endocardial endothelial cells. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **84**:299-307.

KAMAL M.T. (2003) L'angiotensine II et ses récepteurs AT(1) et AT(2) dans les cellules endothéliales vasculaires aortiques humaines: Présence, distribution et modulation du calcium intracellulaire. Thèse (M.Sc.)--Université de Sherbrooke, *Sherbrooke*, 166p.

KAMBAYASHI Y., BARDHAN S. et INAGAMI T. (1993) Peptide growth factors markedly decrease the ligand binding of angiotensin II type 2 receptor in rat cultured vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **194**:478-482.

KANAIDE H. (1996) Endothelin regulation of vascular tonus. *Gen. Pharmacol.* **27**:559-563.

KARMAZYN M. (1996) The role of endothelins in cardiac function in health and disease. *EXS* **76**:209-230.

KARNE S., JAYAWICKREME C.K. et LERNER M.R. (1993) Cloning and characterization of an endothelin-3 specific receptor (ETC receptor) from *Xenopus laevis* dermal melanophores. *J. Biol. Chem.* **268**:19126-19133.

KAWANABE Y. et NAULI S.M. (2005) Involvement of extracellular Ca²⁺ influx through voltage-independent Ca²⁺ channels in endothelin-1 function. *Cell. Signal.* **17**:911-916.

KEDZIERSKI R.M. et YANAGISAWA M. (2001) Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **41**:851-876.

KLOOG Y., AMBAR I., SOKOLOVSKY M., KOCHVA E., WOLLBERG Z. et BDOLAH A. (1988) Sarafotoxin, a novel vasoconstrictor peptide: phosphoinositide hydrolysis in rat heart and brain. *Science* **242**:268-270.

KOUREMBANAS S., MCQUILLAN L.P., LEUNG G.K. et FALLER D.V. (1993) Nitric oxide regulates the expression of vasoconstrictors and growth factors by vascular endothelium under both normoxia and hypoxia. *J. Clin. Invest.* **92**:99-104.

KURUVILLA L. et KARTHA C.C. (2003) Molecular mechanisms in endothelial regulation of cardiac function. *Mol. Cell. Biochem.* **253**:113-123.

KURUVILLA L., NAIR R.R., UMASHANKAR P.R., LAL A.V. et KARTHA C.C. (2007) Endocardial endothelial cells stimulate proliferation and collagen synthesis of cardiac fibroblasts. *Cell Biochem. Biophys.* **47**:65-72.

LANG C.C., STEIN C.M., HE H.B. et WOOD A.J. (1996) Angiotensin converting enzyme inhibition and sympathetic activity in healthy subjects. *Clin. Pharmacol. Ther.* **59**:668-674.

LANINI L., BACHS O. et CARAFOLI E. (1992) The calcium pump of the liver nuclear membrane is identical to that of endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **267**:11548-11552.

LANTOINE F., IOUZALEN L., DEVYNCK M.A., MILLANVOYE-VAN BRUSSEL E. et DAVID-DUFILHO M. (1998) Nitric oxide production in human endothelial cells stimulated by histamine requires Ca^{2+} influx. *Biochem. J.* **330** (Pt 2):695-699.

LASKEY R.E., ADAMS D.J., JOHNS A., RUBANYI G.M. et VAN BREEMEN C. (1990) Membrane potential and Na^{+} - K^{+} pump activity modulate resting and bradykinin-stimulated changes in cytosolic free calcium in cultured endothelial cells from bovine atria. *J. Biol. Chem.* **265**:2613-2619.

LAVALLEE M. et THORIN E. (2003) Role of ET-1 in the regulation of coronary circulation. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **81**:570-577.

LEE D.K., LANCA A.J., CHENG R., NGUYEN T., JI X.D., GOBEIL F., JR, CHEMTOB S., GEORGE S.R. et O'DOWD B.F. (2004) Agonist-independent nuclear localization of the Apelin, angiotensin AT1, and bradykinin B2 receptors. *J. Biol. Chem.* **279**:7901-7908.

LEE K.B., PALS-RYLAARSDAM R., BENOVIĆ J.L. et HOSEY M.M. (1998) Arrestin-independent internalization of the m1, m3, and m4 subtypes of muscarinic cholinergic receptors. *J. Biol. Chem.* **273**:12967-12972.

LEE M.E., DE LA MONTE S.M., NG S.C., BLOCH K.D. et QUERTERMOUS T. (1990) Expression of the potent vasoconstrictor endothelin in the human central nervous system. *J. Clin. Invest.* **86**:141-147.

LEJBKOWICZ F., GOYER C., DARVEAU A., NERON S., LEMIEUX R. et SONENBERG N. (1992) A fraction of the mRNA 5' cap-binding protein, eukaryotic initiation factor 4E, localizes to the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**:9612-9616.

LEVIN E.R. (1995) Endothelins. *N. Engl. J. Med.* **333**:356-363.

LIANG B.T. (1992) Adenosin receptors and cardiovascular function. *Trends Cardiovasc. Med.* **2**:100-108.

LIAO W., HO C.Y., YAN Y.L., POSTLETHWAIT J. et STAINIER D.Y. (2000) Hhex and scl function in parallel to regulate early endothelial and blood differentiation in zebrafish. *Development* **127**:4303-4313.

- LIN H.Y., KAJI E.H., WINKEL G.K., IVES H.E. et LODISH H.F. (1991) Cloning and functional expression of a vascular smooth muscle endothelin 1 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**:3185-3189.
- LOWENSTEIN C.J., MORRELL C.N. et YAMAKUCHI M. (2005) Regulation of Weibel-Palade body exocytosis. *Trends Cardiovasc. Med.* **15**:302-308.
- LU D., YANG H., SHAW G. et RAIZADA M.K. (1998) Angiotensin II-induced nuclear targeting of the angiotensin type 1 (AT1) receptor in brain neurons. *Endocrinology* **139**:365-375.
- LUND E. et DAHLBERG J.E. (1998) Proofreading and aminoacylation of tRNAs before export from the nucleus. *Science* **282**:2082-2085.
- MAEMURA K., KURIHARA H., MORITA T., OH-HASHI Y. et YAZAKI Y. (1992) Production of endothelin-1 in vascular endothelial cells is regulated by factors associated with vascular injury. *Gerontology* **38 Suppl 1**:29-35.
- MAGGI C.A., GIULIANI S., PATACCHINI R., TURINI D., BARBANTI G., GIACHETTI A. et MELI A. (1989) Multiple sources of calcium for contraction of the human urinary bladder muscle. *Br. J. Pharmacol.* **98**:1021-1031.
- MAGGI C.A., GIULIANI S., PATACCHINI R., BARBANTI G., TURINI D. et MELI A. (1990) Contractile responses of the human urinary bladder, renal pelvis and renal artery to endothelins and sarafotoxin S6b. *Gen. Pharmacol.* **21**:247-249.
- MALVIYA A.N. (1994) The nuclear inositol 1,4,5-trisphosphate and inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate receptors. *Cell Calcium* **16**:301-313.
- MALVIYA A.N. et ROGUE P.J. (1998) "Tell me where is calcium bred": clarifying the roles of nuclear calcium. *Cell* **92**:17-23.
- MANABE K., ITO H., MATSUDA H., NOMA A. et SHIBATA Y. (1995) Classification of ion channels in the luminal and abluminal membranes of guinea-pig endocardial endothelial cells. *J. Physiol.* **484 (Pt 1)**:41-52.
- MARIEB E.N. et LACHAÎNE R. (2005) Anatomie et physiologie humaines. 3e éd. Saint-Laurent, Qué.: Éd. du Renouveau pédagogique, 1288 p.
- MARRON K., WHARTON J., SHEPPARD M.N., GULBENKIAN S., ROYSTON D., YACoub M.H., ANDERSON R.H. et POLAK J.M. (1994) Human endocardial innervation and its relationship to the endothelium: an immunohistochemical, histochemical, and quantitative study. *Cardiovasc. Res.* **28**:1490-1499.

MARRON K., WHARTON J., SHEPPARD M.N., FAGAN D., ROYSTON D., KUHN D.M., DE LEVAL M.R., WHITEHEAD B.F., ANDERSON R.H. et POLAK J.M. (1995) Distribution, morphology, and neurochemistry of endocardial and epicardial nerve terminal arborizations in the human heart. *Circulation* **92**:2343-2351.

MARSAULT R., FEOLDE E. et FRELIN C. (1993) Receptor externalization determines sustained contractile responses to endothelin-1 in the rat aorta. *Am. J. Physiol.* **264**:C687-93.

MASAKI T. (1998) The discovery of endothelins. *Cardiovasc. Res.* **39**:530-533.

MASAKI T., NINOMIYA H., SAKAMOTO A. et OKAMOTO Y. (1999) Structural basis of the function of endothelin receptor. *Mol. Cell. Biochem.* **190**:153-156.

MATSUMOTO H., SUZUKI N., ONDA H. et FUJINO M. (1989) Abundance of endothelin-3 in rat intestine, pituitary gland and brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **164**:74-80.

MAZZANTI M., BUSTAMANTE J.O. et OBERLEITHNER H. (2001) Electrical dimension of the nuclear envelope. *Physiol. Rev.* **81**:1-19.

MEBAZAA A., MAYOUX E., MAEDA K., MARTIN L.D., LAKATTA E.G., ROBOTHAM J.L. et SHAH A.M. (1993a) Paracrine effects of endocardial endothelial cells on myocyte contraction mediated via endothelin. *Am. J. Physiol.* **265**:H1841-6.

MEBAZAA A., MARTIN L.D., ROBOTHAM J.L., MAEDA K., GABRIELSON E.W. et WETZEL R.C. (1993b) Right and left ventricular cultured endocardial endothelium produces prostacyclin and PGE2. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **25**:245-248.

MELAX H. et LEESON T.S. (1967) Fine structure of the endocardium in adult rats. *Cardiovasc. Res.* **1**:349-355.

MEULEMANS A.L., SIPIDO K.R., SYS S.U. et BRUTSAERT D.L. (1988) Atriopeptin III induces early relaxation of isolated mammalian papillary muscle. *Circ. Res.* **62**:1171-1174.

MEULEMANS A.L., ANDRIES L.J. et BRUTSAERT D.L. (1990a) Does endocardial endothelium mediate positive inotropic response to angiotensin I and angiotensin II? *Circ. Res.* **66**:1591-1601.

MEULEMANS A.L., ANDRIES L.J. et BRUTSAERT D.L. (1990b) Endocardial endothelium mediates positive inotropic response to alpha 1-adrenoceptor agonist in mammalian heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **22**:667-685.

MILLER R.C., PELTON J.T. et HUGGINS J.P. (1993) Endothelins--from receptors to medicine. *Trends Pharmacol. Sci.* **14**:54-60.

MIQUEROL L., GERTSENSTEIN M., HARPAL K., ROSSANT J. et NAGY A. (1999) Multiple developmental roles of VEGF suggested by a LacZ-tagged allele. *Dev. Biol.* **212**:307-322.

MIYAUCHI T. et MASAKI T. (1999) Pathophysiology of endothelin in the cardiovascular system. *Annu. Rev. Physiol.* **61**:391-415.

MIZUGUCHI T., NISHIYAMA M., MOROI K., TANAKA H., SAITO T., MASUDA Y., MASAKI T., DE WIT D., YANAGISAWA M. et KIMURA S. (1997) Analysis of two pharmacologically predicted endothelin B receptor subtypes by using the endothelin B receptor gene knockout mouse. *Br. J. Pharmacol.* **120**:1427-1430.

MOHAN P., BRUTSAERT D.L. et SYS S.U. (1995) Myocardial performance is modulated by interaction of cardiac endothelium derived nitric oxide and prostaglandins. *Cardiovasc. Res.* **29**:637-640.

NADER M.A. (2005) Présence des récepteurs couplés aux protéines G de l'ET-1 et de l'Ang II ainsi que de l'échangeur Sodium-Hydrogène au niveau nucléaire : Le noyau serait-il une cellule à l'intérieur de la cellule? Thèse (Ph.D.)-- Université de Sherbrooke, *Sherbrooke*, 310p.

NAKAJIMA M., MUKOYAMA M., PRATT R.E., HORIUCHI M. et DZAU V.J. (1993) Cloning of cDNA and analysis of the gene for mouse angiotensin II type 2 receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **197**:393-399.

NAMBI P., PULLEN M., BROOKS D.P. et GELLAI M. (1995) Identification of ETB receptor subtypes using linear and truncated analogs of ET. *Neuropeptides* **29**:331-336.

NAMIKI A., HIRATA Y., ISHIKAWA M., MOROI M., AIKAWA J. et MACHII K. (1992) Endothelin-1- and endothelin-3-induced vasorelaxation via common generation of endothelium-derived nitric oxide. *Life Sci.* **50**:677-682.

NAOMI S., IWAOKA T., DISASHI T., INOUE J., KANESAKA Y., TOKUNAGA H. et TOMITA K. (1998) Endothelin-1 inhibits endothelin-converting enzyme-1 expression in cultured rat pulmonary endothelial cells. *Circulation* **97**:234-236.

NEYLON C.B. (1999) Vascular biology of endothelin signal transduction. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **26**:149-153.

NIGGLI E. et LEDERER W.J. (1990) Real-time confocal microscopy and calcium measurements in heart muscle cells: towards the development of a fluorescence microscope with high temporal and spatial resolution. *Cell Calcium* **11**:121-130.

NIGGLI E., PISTON D.W., KIRBY M.S., CHENG H., SANDISON D.R., WEBB W.W. et LEDERER W.J. (1994) A confocal laser scanning microscope designed for indicators with ultraviolet excitation wavelengths. *Am. J. Physiol.* **266**:C303-10.

NILIUS B. et DROOGMANS G. (2001) Ion channels and their functional role in vascular endothelium. *Physiol. Rev.* **81**:1415-1459.

NILIUS B. et RIEMANN D. (1990) Ion channels in human endothelial cells. *Gen. Physiol. Biophys.* **9**:89-111.

NILIUS B., PRENEN J., VOETS T., VAN DEN BREMT K., EGGERMONT J. et DROOGMANS G. (1997) Kinetic and pharmacological properties of the calcium-activated chloride-current in macrovascular endothelial cells. *Cell Calcium* **22**:53-63.

OAKLEY R.H., LAPORTE S.A., HOLT J.A., BARAK L.S. et CARON M.G. (1999) Association of beta-arrestin with G protein-coupled receptors during clathrin-mediated endocytosis dictates the profile of receptor resensitization. *J. Biol. Chem.* **274**:32248-32257.

OHLSTEIN E.H., ARLETH A., BRYAN H., ELLIOTT J.D. et SUNG C.P. (1992) The selective endothelin ETA receptor antagonist BQ123 antagonizes endothelin-1-mediated mitogenesis. *Eur. J. Pharmacol.* **225**:347-350.

OKAMOTO Y., NINOMIYA H., TANIOKA M., SAKAMOTO A., MIWA S. et MASAKI T. (1997) Palmitoylation of human endothelinB. Its critical role in G protein coupling and a differential requirement for the cytoplasmic tail by G protein subtypes. *J. Biol. Chem.* **272**:21589-21596.

OKAMOTO T., SCHLEGEL A., SCHERER P.E. et LISANTI M.P. (1998) Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **273**:5419-5422.

OKAMOTO Y., NINOMIYA H., MIWA S. et MASAKI T. (2000) Cholesterol oxidation switches the internalization pathway of endothelin receptor type A from caveolae to clathrin-coated pits in Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* **275**:6439-6446.

OKSCHE A., BOESE G., HORSTMAYER A., FURKERT J., BEYERMANN M., BIENERT M. et ROSENTHAL W. (2000) Late endosomal/lysosomal targeting and lack of recycling of the ligand-occupied endothelin B receptor. *Mol. Pharmacol.* **57**:1104-1113.

PAASCHE J.D., ATTRAMADAL T., SANDBERG C., JOHANSEN H.K. et ATTRAMADAL H. (2001) Mechanisms of endothelin receptor subtype-specific targeting to distinct intracellular trafficking pathways. *J. Biol. Chem.* **276**:34041-34050.

PAASCHE J.D., ATTRAMADAL T., KRISTIANSEN K., OKSVOLD M.P., JOHANSEN H.K., HUITFELDT H.S., DAHL S.G. et ATTRAMADAL H. (2005) Subtype-specific sorting of the ETA endothelin receptor by a novel endocytic recycling signal for G protein-coupled receptors. *Mol. Pharmacol.* **67**:1581-1590.

PAGE C., ROSE M., YACoub M. et PIGOTT R. (1992) Antigenic heterogeneity of vascular endothelium. *Am. J. Pathol.* **141**:673-83.

PALAY S.L. et PALADE G.E. (1955) The fine structure of neurons. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **1**:69-88.

PATEL T.R., GALBRAITH S.L., MCAULEY M.A., DOHERTY A.M., GRAHAM D.I. et MCCULLOCH J. (1995) Therapeutic potential of endothelin receptor antagonists in experimental stroke. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **26 Suppl 3**:S412-5.

PAUL M. et GANTEN D. (1992) The molecular basis of cardiovascular hypertrophy: the role of the renin-angiotensin system. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **19 Suppl 5**:S51-8.

PERREAULT C. (2004) Récepteurs du NPY au niveau des membranes de l'enveloppe nucléaire de l'endothélium endocardique humain : rôle dans la régulation du calcium nucléoplasmique. Thèse (M.Sc.)--Université de Sherbrooke, *Sherbrooke*, 163p.

PIPPIG S., ANDEXINGER S. et LOHSE M.J. (1995) Sequestration and recycling of beta 2-adrenergic receptors permit receptor resensitization. *Mol. Pharmacol.* **47**:666-676.

PLUMPTON C., CHAMPENEY R., ASHBY M.J., KUC R.E. et DAVENPORT A.P. (1993) Characterization of endothelin isoforms in human heart: endothelin-2 demonstrated. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **22 Suppl 8**:S26-8.

PURI M.C., PARTANEN J., ROSSANT J. et BERNSTEIN A. (1999) Interaction of the TEK and TIE receptor tyrosine kinases during cardiovascular development. *Development* **126**:4569-4580.

QANBAR R. et BOUVIER M. (2003) Role of palmitoylation/depalmitoylation reactions in G-protein-coupled receptor function. *Pharmacol. Ther.* **97**:1-33.

RE R.N., MACPHEE A.A. et FALLON J.T. (1981) Specific nuclear binding of angiotensin II by rat liver and spleen nuclei. *Clin. Sci. (Lond)* **61 Suppl 7**: 245s-247s.

REDMOND E.M., CAHILL P.A., HODGES R., ZHANG S. et SITZMANN J.V. (1996) Regulation of endothelin receptors by nitric oxide in cultured rat vascular smooth muscle cells. *J. Cell. Physiol.* **166**:469-479.

RHODIN JOHANNES A. G. (1974) Histology : a text and atlas. New York ; Toronto: Oxford University Press, 803 p.

RIOPEL J. (2006) Rôle du récepteur ET[indice inférieur A] dans la modulation du calcium intracellulaire des cellules endothéliales aortiques humaines. Thèse (M.Sc.)--Université de Sherbrooke, *Sherbrooke*, 153p.

ROUBERT P., GILLARD V., PLAS P., CHABRIER P.E. et BRAQUET P. (1991) Binding characteristics of endothelin isoforms (ET-1, ET-2, and ET-3) in vascular smooth muscle cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **17 Suppl 7**:S104-8.

RUBANYI G.M. et POLOKOFF M.A. (1994) Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacol. Rev.* **46**:325-415.

RUBIN L.L. et STADDON J.M. (1999) The cell biology of the blood-brain barrier. *Annu. Rev. Neurosci.* **22**:11-28.

SADER S. (2002) Évolution de l'expression du NPY et de ses récepteurs dans l'endothélium endocardique au cours du développement foetal chez l'humain : rôle du NPY dans l'homéostasie calcique intracellulaire. Thèse (Ph.D.)--Université de Sherbrooke, *Sherbrooke*, 262p.

SAETRUM OPGAARD O., ADNER M., GULBENKIAN S. et EDVINSSON L. (1994) Localization of endothelin immunoreactivity and demonstration of constrictory endothelin-A receptors in human coronary arteries and veins. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **23**:576-583.

SAETRUM OPGAARD O., ADNER M., PETERS T.H., XU C.B., STAVENOW L., GULBENKIAN S., ERLINGE D., EDVINSSON L. et SHARMA H.S. (2001) Endocardial expression and functional characterization of endothelin-1. *Mol. Cell. Biochem.* **224**:151-158.

SAFFITZ J.E., NASH J.A., GREEN K.G., LUKE R.A., RANSNAS L.A. et INSEL P.A. (1994) Immunoelectron microscopic identification of cytoplasmic and nuclear Gs alpha in S49 lymphoma cells. *FASEB J.* **8**:252-258.

SAKAMOTO A., YANAGISAWA M., SAKURAI T., TAKUWA Y., YANAGISAWA H. et MASAKI T. (1991) Cloning and functional expression of human cDNA for the ETB endothelin receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **178**:656-663.

SAKURAI T., YANAGISAWA M., TAKUWA Y., MIYAZAKI H., KIMURA S., GOTO K. et MASAKI T. (1990) Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature* **348**:732-735.

SANCHEZ R., MACKENZIE A., FARHAT N., NGUYEN T.D., STEWART D.J., MERCIER I., CALDERONE A. et THORIN E. (2002) Endothelin B receptor-mediated regulation of endothelin-1 content and release in cultured porcine aorta endothelial cell. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **39**:652-659.

SATO T.N., TOZAWA Y., DEUTSCH U., WOLBURG-BUCHHOLZ K., FUJIWARA Y., GENDRON-MAGUIRE M., GRIDLEY T., WOLBURG H., RISAU W. et QIN Y. (1995) Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature* **376**:70-74.

SCHIEVELLA A.R., REGIER M.K., SMITH W.L. et LIN L.L. (1995) Calcium-mediated translocation of cytosolic phospholipase A2 to the nuclear envelope and endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **270**:30749-30754.

SCHIFFRIN E.L. (2005) Vascular endothelin in hypertension. *Vascul Pharmacol.* **43**:19-29.

SCHIFFRIN E.L. et TOUYZ R.M. (1998) Vascular biology of endothelin. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **32 Suppl 3**:S2-13.

SCHNEIDER M.P., BOESEN E.I. et POLLOCK D.M. (2007) Contrasting Actions of Endothelin ET(A) and ET(B) Receptors in Cardiovascular Disease. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **47**:731-759.

SCHULZ R., SMITH J.A., LEWIS M.J. et MONCADA S. (1991) Nitric oxide synthase in cultured endocardial cells of the pig. *Br. J. Pharmacol.* **104**:21-24.

SCHWARTZ G.L. (1990) Initial therapy for hypertension--individualizing care. *Mayo Clin. Proc.* **65**:73-87.

SCOTT M.G., BENMERAH A. et MARULLO S. (2004) G protein coupled receptor endocytosis. *Med. Sci. (Paris)* **20**:78-83.

SHAH A.M. (1996) Paracrine modulation of heart cell function by endothelial cells. *Cardiovasc. Res.* **31**:847-867.

SHAH A.M., GROCOTT-MASON R.M., PEPPER C.B., MEBAZAA A., HENDERSON A.H., LEWIS M.J. et PAULUS W.J. (1996) The cardiac endothelium: cardioactive mediators. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **39**:263-284.

SHALABY F., ROSSANT J., YAMAGUCHI T.P., GERTSENSTEIN M., WU X.F., BREITMAN M.L. et SCHUH A.C. (1995) Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* **376**:62-66.

SHICHIRI M., KATO H., MARUMO F. et HIRATA Y. (1997) Endothelin-1 as an autocrine/paracrine apoptosis survival factor for endothelial cells. *Hypertension* **30**:1198-1203.

SHICHIRI M., MARUMO F. et HIRATA Y. (1998) Endothelin-B receptor-mediated suppression of endothelial apoptosis. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **31 Suppl 1**:S138-41.

SIMONSON M.S. (1993) Endothelins: multifunctional renal peptides. *Physiol. Rev.* **73**:375-411.

SMITH P.J., TEICHERT-KULISZEWSKA K., MONGE J.C. et STEWART D.J. (1998) Regulation of endothelin-B receptor mRNA expression in human endothelial cells by cytokines and growth factors. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **31 Suppl 1**:S158-60.

SOKOLOVSKY M. (1992) Structure-function relationships of endothelins, sarafotoxins, and their receptor subtypes. *J. Neurochem.* **59**:809-821.

SOKOLOVSKY M., AMBAR I. et GALRON R. (1992) A novel subtype of endothelin receptors. *J. Biol. Chem.* **267**:20551-20554.

SOKOLOVSKY M. (1994) Endothelins and sarafotoxins: receptor heterogeneity. *Int. J. Biochem.* **26**:335-340.

SOKOLOVSKY M. (1995a) Endothelin receptor heterogeneity, G-proteins, and signaling via cAMP and cGMP cascades. *Cell. Mol. Neurobiol.* **15**:561-571.

SOKOLOVSKY M. (1995b) Endothelin receptor subtypes and their role in transmembrane signaling mechanisms. *Pharmacol. Ther.* **68**:435-471.

SPEEDING M. et PAOLETTI R. (1992) Classification of calcium channels and calcium antagonists: progress report. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **6**:35-39.

SPORN L.A., MARDER V.J. et WAGNER D.D. (1989) Differing polarity of the constitutive and regulated secretory pathways for von Willebrand factor in endothelial cells. *J. Cell Biol.* **108**:1283-1289.

STEIN P.D., HUNT J.T., FLOYD D.M., MORELAND S., DICKINSON K.E., MITCHELL C., LIU E.C., WEBB M.L., MURUGESAN N. et DICKEY J. (1994) The discovery of sulfonamide endothelin antagonists and the development of the orally active ETA antagonist 5-(dimethylamino)-N-(3,4-dimethyl-5-isoxazolyl)-1-naphthalenesulfonamide. *J. Med. Chem.* **37**:329-331.

SUDJARWO S.A., HORI M., TAKAI M., URADE Y., OKADA T. et KARAKI H. (1993) A novel subtype of endothelin B receptor mediating contraction in swine pulmonary vein. *Life Sci.* **53**:431-437.

SUGISHITA Y., TAKAHASHI T., SHIMIZU T., YAO A., KINUGAWA K., SUGISHITA K., HARADA K., MATSUI H. et NAGAI R. (2000) Expression of genes encoding vascular endothelial growth factor and its Flk-1 receptor in the chick embryonic heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **32**:1039-1051.

SURI C., JONES P.F., PATAN S., BARTUNKOVA S., MAISONPIERRE P.C., DAVIS S., SATO T.N. et YANCOPOULOS G.D. (1996) Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* **87**:1171-1180.

TAKAI M., UMEMURA I., YAMASAKI K., WATAKABE T., FUJITANI Y., ODA K., URADE Y., INUI T., YAMAMURA T. et OKADA T. (1992) A potent and specific agonist, Suc-[Glu⁹,Ala^{11,15}]-endothelin-1(8-21), IRL 1620, for the ETB receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **184**:953-959.

TAKATA K., HIRANO H. et KASAHARA M. (1997) Transport of glucose across the blood-tissue barriers. *Int. Rev. Cytol.* **172**:1-53.

TAKAYANAGI R., KITAZUMI K., TAKASAKI C., OHNAKA K., AIMOTO S., TASAKA K., OHASHI M. et NAWATA H. (1991) Presence of non-selective type of endothelin receptor on vascular endothelium and its linkage to vasodilation. *FEBS Lett.* **282**:103-106.

TAKEDA K. et KLEPPER M. (1990) Voltage-dependent and agonist-activated ionic currents in vascular endothelial cells: a review. *Blood Vessels* **27**:169-183.

TAKEDA K., SCHINI V. et STOECKEL H. (1987) Voltage-activated potassium, but not calcium currents in cultured bovine aortic endothelial cells. *Pflugers Arch.* **410**:385-393.

TAKIGAWA M., SAKURAI T., KASUYA Y., ABE Y., MASAKI T. et GOTO K. (1995) Molecular identification of guanine-nucleotide-binding regulatory proteins which couple to endothelin receptors. *Eur. J. Biochem.* **228**:102-108.

TANG S.S., ROGG H., SCHUMACHER R. et DZAU V.J. (1992) Characterization of nuclear angiotensin-II-binding sites in rat liver and comparison with plasma membrane receptors. *Endocrinology* **131**:374-380.

TANOWITZ M. et VON ZASTROW M. (2003) A novel endocytic recycling signal that distinguishes the membrane trafficking of naturally occurring opioid receptors. *J. Biol. Chem.* **278**:45978-45986.

TONNESSEN T., GIAID A., SALEH D., NAESS P.A., YANAGISAWA M. et CHRISTENSEN G. (1995) Increased in vivo expression and production of endothelin-1 by porcine cardiomyocytes subjected to ischemia. *Circ. Res.* **76**:767-772.

- TOSTES R.C., TOUYZ R.M., HE G., CHEN X. et SCHIFFRIN E.L. (2002) Contribution of endothelin-1 to renal activator protein-1 activation and macrophage infiltration in aldosterone-induced hypertension. *Clin. Sci. (Lond)* **103 Suppl 48**:25S-30S.
- TRAN Q.K., OHASHI K. et WATANABE H. (2000) Calcium signalling in endothelial cells. *Cardiovasc. Res.* **48**:13-22.
- TREJO J. et COUGHLIN S.R. (1999) The cytoplasmic tails of protease-activated receptor-1 and substance P receptor specify sorting to lysosomes versus recycling. *J. Biol. Chem.* **274**:2216-2224.
- TRIGGLE D.J. (1999) The pharmacology of ion channels: with particular reference to voltage-gated Ca²⁺ channels. *Eur. J. Pharmacol.* **375**:311-325.
- TURNER N.C., POWER R.F., POLAK J.M., BLOOM S.R. et DOLLERY C.T. (1989) Endothelin-induced contractions of tracheal smooth muscle and identification of specific endothelin binding sites in the trachea of the rat. *Br. J. Pharmacol.* **98**:361-366.
- VANE J.R. (1968) The release and assay of hormones in the circulation. *Sci. Basis Med. Annu. Rev.* :336-358.
- VERHAAR M.C., GRAHN A.Y., VAN WEERDT A.W., HONING M.L., MORRISON P.J., YANG Y.P., PADLEY R.J. et RABELINK T.J. (2000) Pharmacokinetics and pharmacodynamic effects of ABT-627, an oral ETA selective endothelin antagonist, in humans. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **49**:562-573.
- VON ZASTROW M. et KOBILKA B.K. (1992) Ligand-regulated internalization and recycling of human beta 2-adrenergic receptors between the plasma membrane and endosomes containing transferrin receptors. *J. Biol. Chem.* **267**:3530-3538.
- WAGGONER W.G., GENOVA S.L. et RASH V.A. (1992) Kinetic analyses demonstrate that the equilibrium assumption does not apply to [¹²⁵I]endothelin-1 binding data. *Life Sci.* **51**:1869-1876.
- WANG J. et MORGAN J.P. (1992) Endocardial endothelium modulates myofilament Ca²⁺ responsiveness in aequorin-loaded ferret myocardium. *Circ. Res.* **70**:754-760.
- WARNER T.D., MITCHELL J.A., DE NUCCI G. et VANE J.R. (1989) Endothelin-1 and endothelin-3 release EDRF from isolated perfused arterial vessels of the rat and rabbit. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **13 Suppl 5**:S85-8; discussion S102.
- WEBB D.J. (1991) Endothelin receptors cloned, endothelin converting enzyme characterized and pathophysiological roles for endothelin proposed. *Trends Pharmacol. Sci.* **12**:43-46.

WEBB D.J., MONGE J.C., RABELINK T.J. et YANAGISAWA M. (1998) Endothelin: new discoveries and rapid progress in the clinic. *Trends Pharmacol. Sci.* **19**:5-8.

WHITE G.E., GIMBRONE M.A.J. et FUJIWARA K. (1983) Factors influencing the expression of stress fibers in vascular endothelial cells *in situ*. *J. Cell Biol.* **97**:416-24.

WU-WONG J.R., DIXON D.B., CHIOU W.J., SORENSEN B.K., LIU G., JAE H.S., TASKER A., VON GELDERN T.W., WINN M. et OPGENORTH T.J. (2002) Pharmacology of endothelin receptor antagonists ABT-627, ABT-546, A-182086 and A-192621: in vitro studies. *Clin. Sci. (Lond)* **103** Suppl 48:107S-111S.

XIE X., WU G., LU Z.H. et LEDEEN R.W. (2002) Potentiation of a sodium-calcium exchanger in the nuclear envelope by nuclear GM1 ganglioside. *J. Neurochem.* **81**:1185-1195.

XU B., DEWAAL R.M., MOR-VAKNIN N., HIBBARD C., MARKOVITZ D.M. et KAHN M.L. (2004) The endothelial cell-specific antibody PAL-E identifies a secreted form of vimentin in the blood vasculature. *Mol. Cell. Biol.* **24**:9198-9206.

YAMAGUCHI T., MURATA Y., FUJIYOSHI Y. et DOI T. (2003) Regulated interaction of endothelin B receptor with caveolin-1. *Eur. J. Biochem.* **270**:1816-1827.

YAMAMOTO S., KAWAMURA K. et JAMES T.N. (1998) Intracellular distribution of adenylate cyclase in human cardiocytes determined by electron microscopic cytochemistry. *Microsc. Res. Tech.* **40**:479-487.

YANAGISAWA M., KURIHARA H., KIMURA S., GOTO K. et MASAKI T. (1988a) A novel peptide vasoconstrictor, endothelin, is produced by vascular endothelium and modulates smooth muscle Ca²⁺ channels. *J. Hypertens. Suppl.* **6**:S188-91.

YANAGISAWA M., KURIHARA H., KIMURA S., TOMOBE Y., KOBAYASHI M., MITSUI Y., YAZAKI Y., GOTO K. et MASAKI T. (1988b) A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* **332**:411-415.

YANAGISAWA M. et MASAKI T. (1989) Molecular biology and biochemistry of the endothelins. *Trends Pharmacol. Sci.* **10**:374-378.